

世界知的所有権機関
国際事務局



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/12</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/24444</p> <p>(43) 国際公開日 1997年7月10日(10.07.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03869</p> <p>(22) 国際出願日 1996年12月26日(26.12.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/353778 1995年12月27日(27.12.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 上森隆司(UEMORI, Takashi)(JP/JP) 〒520-21 滋賀県大津市大江三丁目1番16号 Shiga, (JP) 石野良純(ISHINO, Yoshizumi)(JP/JP) 〒569 大阪府高槻市富田町一丁目19番14号 Osaka, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611 京都府宇治市南陵町一丁目1番150号 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, MX, US, VN, ユーラシア 特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: NOVEL DNA POLYMERASE</p> <p>(54) 発明の名称 新規DNAポリメラーゼ</p> <p>(57) Abstract A DNA polymerase having the following characteristics: (1) showing a polymerase activity on a complex employed as a substrate wherein a primer has been annealed with a single-stranded template DNA higher than the activity on an activated DNA employed as a substrate; (2) having a 3'→5' exonuclease activity; and (3) when subjected to a PCR reaction with the use of a λ-DNA as a template, being capable of amplifying a DNA fragment of about 20 kbp without the necessity for adding any other enzyme; a protein constituting the DNA polymerase; a DNA containing a base sequence encoding the same; and a process for producing the DNA polymerase. This DNA polymerase is a novel one having both of a high primer extensibility and the 3'→5' exonuclease activity.</p>		

(57) 要約

① 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す、② 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する、③ λ-DNAを鋳型としたPCR反応を行った場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である、という性質を有するDNAポリメラーゼ、該DNAポリメラーゼ構成タンパク、それをコードする塩基配列を含むDNA、および該DNAポリメラーゼの製造方法に関する。本発明により、高いプライマー伸長性と3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性とを合わせ持つ新規なDNAポリメラーゼが提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EE	エストニア	LS	レソト	DE	ドイツ
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BB	バハマ	GB	グレートブリテン及び北アイルランド連合王国	MC	モナコ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GG	ガイアナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	ス威士ランド
BR	ブラジル	HN	ホンデュラス	MK	マケドニア	TD	チュニジア
BV	ブーヴィエ	HU	ハンガリー	VI	ヴァティカン	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IE	アイルランド	ML	マリ	TR	トルコ
CC	ココス（キリング）	IT	イタリア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ（ブラザヴィル）	KE	ケニア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	KG	キルギス	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	KR	大韓民国	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	KN	セントクリストファー・ネイビス	NL	オランダ	VN	ベトナム
CN	中国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド		
CO	コロンビア	LA	ラオス	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ			RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						
DK	デンマーク						

明 細 書

新規DNAポリメラーゼ

技術分野

本発明は遺伝子工学用試薬として有用なDNAポリメラーゼ及びその製造方法、さらにそれをコードする遺伝子に関する。

背景技術

DNAポリメラーゼは遺伝子工学用試薬として有用な酵素であり、DNA塩基配列決定法、標識化、部位特異的変異導入法などに広く利用されている。また最近ではポリメラーゼ チェーン リアクション（PCR）法の開発により、耐熱性DNAポリメラーゼが注目を集め、PCR法に適した種々のDNAポリメラーゼが開発され、商品化されている。

現在知られているDNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列の共通性から大きく4つのファミリーに分類することができ、中でもファミリーA（ポリⅠ型酵素）とファミリーB（ α 型酵素）が大多数を占めている。それぞれのファミリーに属するDNAポリメラーゼは概ね類似した生化学的特性を有しているが、詳細に比較すると個々の酵素によって基質特異性、基質アナログの取込み、プライマー伸長性の強さ及び速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性の付随、温度、pHなどの至適反応条件、また阻害剤に対する感受性などについて異なる性質を有している。したがってこれまで実験操作に応じてそれぞれ現存する中で最も適した性質を有するDNAポリメラーゼが選ばれ利用されている。

発明の開示

本発明の目的は、上記のどのファミリーにも属さず、現存するDNAポリメラ

ーゼが有しない生化学的特性をもった新規なDNAポリメラーゼを提供することにある。例えばプライマー伸長活性と3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性は相反する性質とされており、現存するDNAポリメラーゼでプライマー伸長活性の強い酵素は合成の忠実性にとって重要な校正機能である3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有しない。また校正機能が優れているものはプライマー伸長活性が弱い。したがって、強い3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有しながらプライマー伸長活性が強いDNAポリメラーゼの開発は、試験管内でのDNA合成に大いに役立つものである。

本発明の他の目的は、このような新規なDNAポリメラーゼの製造方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、本発明のDNAポリメラーゼをコードする遺伝子を提供することにある。

本発明者らは鋭意研究の結果、超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサスから新規のDNAポリメラーゼ遺伝子を見出し、これをクローニングすることによって2種の新規タンパク質が共存により活性を示す新規DNAポリメラーゼ活性を持つことを明らかにした。更にこれらの遺伝子を導入した形質転換体を作製してこの複合型DNAポリメラーゼを大量生産することに成功し、本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は、

(1) 以下の性質を有することを特徴とするDNAポリメラーゼ、

- ① 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。
- ② 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
- ③ λ-DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 反応を以下の条件で行った場合、約20キロ塩基対のDNA断片を増幅すること

が可能である。

PCRの条件：

(a) 反応液組成：10 mM トリシュー塩酸 (pH 9.2)、3.5 mM MgCl₂、75 mM KCl、400 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1% トリトンX-100、5.0 ng/50 μl λ-DNA、10 pmole/50 μl プライマーλ1 (配列表の配列番号8)、およびプライマーλ11 (配列表の配列番号9)、3.7 単位/50 μl DNAポリメラーゼを含む。

(b) 反応条件：98℃、10秒～68℃、10分を1サイクルとした30サイクルのPCR反応を行う。

(2) Taq DNAポリメラーゼと比較してDNA合成時の誤りの頻度が低いことを特徴とする前記(1)記載のDNAポリメラーゼ、

(3) ゲルろ過法による分子量が約220キロダルトン、あるいは約385キロダルトンである前記(1)又は(2)記載のDNAポリメラーゼ、

(4) 2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク (第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクおよび第2のDNAポリメラーゼ構成タンパク) の共存により活性を示すことを特徴とする前記(1)～(3)いずれか記載のDNAポリメラーゼ、

(5) 第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクおよび第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクのSDS-PAGEによる分子量が、それぞれ約90,000ダルトン、約140,000ダルトンであることを特徴とする前記(4)記載のDNAポリメラーゼ、

(6) 前記(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴

とする前記(4)又は(5)記載のDNAポリメラーゼ、

(7) 前記(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴とする前記(4)又は(5)記載のDNAポリメラーゼ、

(8) 前記(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であり、かつ前記

(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴とする前記(4)又は(5)記載のDNAポリメラーゼ、

(9) 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物としてのアミノ酸配列からなる、前記(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパク、

(10) 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物としてのアミノ酸配列からなる、前記(4)又は(5)に記載のDNAポリメラーゼを構成する第2のDNAポリメラーゼ構成タンパク、

(11) 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の

全部又は一部を含むか、あるいは配列番号1のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換されたアミノ酸配列からなり、かつ第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードすることを特徴とする、前記(9)に記載の第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含むDNA、

(12) 配列表の配列番号2に示される塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいはこの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなることを特徴とする、前記(9)に記載の第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含むDNA、

(13) 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいは配列番号3のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換されたアミノ酸配列からなり、かつ第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードすることを特徴とする、前記(10)に記載の第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含むDNA、

(14) 配列表の配列番号4に示される塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいはこの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなることを特徴とする、前記(10)に記載の第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含むDNA、

(15) 前記(11)又は(12)に記載の第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子と、前記(13)又は(14)に記載の第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子の両方を含有する形質転換体を培養し、該培養物からDNAポリメラーゼを採取することを特徴とするDNAポリメラーゼの製造方法、並びに

(16) 前記(11)又は(12)に記載の第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体と、前記(13)又は(14)

に記載の第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体とをそれぞれ個別に培養し、該培養物中に含まれるDNAポリメラーゼ構成タンパクを混合してDNAポリメラーゼを採取することを特徴とするDNAポリメラーゼの製造方法、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1で得られたコスミドクローンNo. 264とコスミドクローンNo. 491に挿入されたDNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第2図は、プラスミドpFU1001に挿入されたXbaI-XbaI DNA断片の制限酵素地図を示す図である。

第3図は、本発明のDNAポリメラーゼの至適pHを示す図である。

第4図は、本発明のDNAポリメラーゼの熱安定性を示す図である。

第5図は、本発明のDNAポリメラーゼの3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を示す図である。

第6図は、本発明のDNAポリメラーゼのプライマー伸長活性を示すオートラジオグラムの図である。

発明を実施するための最良の形態

(1) 本発明のDNAポリメラーゼおよびその構成タンパク

本発明のDNAポリメラーゼの一例は、以下の性質を有するものである。

- ① 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNA (DNase I 処理仔牛胸腺DNA) を基質とした場合に比べて高い活性を示す。
- ② 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。
- ③ 至適pH: 6.5 ~ 7.0 (リン酸カリウム緩衝液中、75°C)。
- ④ 80°C、30分の熱処理後に約80%の残存活性を示す。

⑤ また、 λ -DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 反応を行った場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である。PCRの条件は次のとおりである。

(イ) PCR反応液組成: 10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2), 3.5 mM $MgCl_2$, 75 mM KCl, 400 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.01% ウシ血清アルブミン (BSA), 0.1% トリトン X-100 (Triton X-100)、5.0 ng/50 μ l λ -DNA、10 pmole/50 μ l プライマー λ 1 (配列表の配列番号8)、およびプライマー λ 11 (配列表の配列番号9)、3.7 単位/50 μ l DNAポリメラーゼを含む。ここで、DNAポリメラーゼの1単位は、次のようにして決定される。活性を測定しようとする試料を含む反応液 [20 mM トリス-塩酸 (pH 7.7), 15 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 0.2 mg/ml 活性化DNA, 40 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 60 nM [3H] dTTP (アマシャム社製)] 50 μ l を調製し、75°Cで15分間反応させ、そのうちの40 μ l をDEペーパー (ワットマン社製) にスポットし、5% Na_2HPO_4 で洗浄を5回行った後にDEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、30分間あたりに10 nmol の [3H] dTMP を基質DNAに取り込む酵素量を酵素1単位とする。

(ロ) PCR反応条件: 98°C、10秒~68°C、10分を1サイクルとした30サイクルのPCR反応を行なう。

⑥ 本発明のDNAポリメラーゼは、プライマー伸長活性、DNA合成の正確性のいずれもがTaq DNAポリメラーゼと比較して優れている。即ち、本発明のDNAポリメラーゼのDNA合成反応の伸長性、例えばPCR法において増幅できるDNAの鎖長や、その反応の正確性 (DNA合成時に起こる誤りの頻度が低いこと) は、ともに代表的な耐熱性DNAポリメラーゼであるTaq DNAポリメラーゼ (例えば宝酒造社製のTaKaRa Taq) に比べ優れている。

本発明のDNAポリメラーゼの分子量は、ゲルろ過法により約220キロダルトン、あるいは約385キロダルトンであり、SDS-PAGE上では約90,000ダルトン、約140,000ダルトンに相当する2本のバンドで示され、2種のタンパクより構成される酵素である。本発明では約90,000ダルトンのもの（後述のORF3に相当する）を第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクと呼び、約140,000ダルトンのもの（後述のORF4に相当する）を第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクと呼ぶ。本発明のDNAポリメラーゼは、第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクと第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクとが、1:1又は1:2のモル比で非共有結合的に複合体を形成しているものと推定される。

本発明のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクは、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいはこれと実質的に同等の活性を有する機能的同等物であってもよい。また、第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクは、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいはこれと実質的に同等の活性を有する機能的同等物であってもよい。

ここで本明細書に記載の「機能的同等物」とは、以下のようなものをいう。天然に存在するタンパクにはそれをコードする遺伝子の多形や変異の他、生成後のタンパクの生体内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、挿入、付加、置換等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパクと実質的に同等の生理学的活性、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に差異があってもその機能や活性については大きな違いが認められないものを機能的同等物と呼ぶ。ここで変異したアミノ酸の数は、実質的に同等の生理学的活性、生物学的活性を示すものであるかぎり特に限定されるものではないが、1以上、例えば1又は数個、より具体的には1～約10個の変異（欠失、挿入、付加、置換等）などが例示される。

人為的にタンパクのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。たとえば、大腸菌で発現されたタンパクのN末端に存在するメチオニン残基は多くの場合メチオニンアミノペプチダーゼの作用により除去されるとされているが、タンパクの種類によってはその除去が完全には行われず、メチオニン残基を持つもの、持たないものの両方が生成される。しかしこのメチオニン残基の有無はタンパクの活性には影響を与えない場合が多い。また、ヒトインターロイキン2（IL-2）のアミノ酸配列中のあるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2活性を保持することが知られている〔サイエンス（Science）、第224巻、1431頁（1984）〕。

さらに、遺伝子工学的にタンパクの生産を行う際には融合タンパクとして発現させることがしばしば行われる。たとえば目的タンパクの発現量を増加させるためにN末端に他のタンパク由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、目的タンパクのN末端、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させ、このペプチド鎖に親和性を持つ担体を使用することにより目的タンパクの精製を容易にすることなどが行われている。したがって本発明のDNAポリメラーゼとは一部異なったアミノ酸配列を有するDNAポリメラーゼであっても、それが本発明のDNAポリメラーゼと本質的に同等の活性を示す限りにおいて、該酵素は「機能的同等物」として本発明の範囲内に属するものである。

（2）本発明のDNAポリメラーゼの遺伝子

本発明のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクをコードするDNAとしては、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部を含むDNA、例えば、配列表の配列番号2に示される塩基配列の全部又は一部を含むDNAが挙げられる。即ち、配列番号1に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部を含むDNA、例えば、

配列表の配列番号 2 に示される塩基配列の一部を含む DNA であっても、第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする塩基配列は本発明の範囲内である。また、配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 以上の例えば 1 又は数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換などされたアミノ酸配列からなり、かつ第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする DNA も挙げられる。また、さらにこれらの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能で、かつ第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする塩基配列も本発明の範囲内である。また、第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする DNA としては、配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部を含む DNA、例えば、配列表の配列番号 4 に示される塩基配列の全部又は一部を含む DNA が挙げられる。即ち、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の一部を含む DNA、例えば、配列表の配列番号 4 に示される塩基配列の一部を含む DNA であっても、第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする塩基配列は本発明の範囲内である。また、配列番号 3 のアミノ酸配列において、1 以上の例えば 1 又は数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換などされたアミノ酸配列からなり、かつ第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする DNA も挙げられる。また、さらにこれらの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能で、かつ第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードする塩基配列も本発明の範囲内である。

ここで、「第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパク」、あるいは「第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパク」とは、これらの 2 種のタンパク質が共存した場合、前記の①～⑥に示された各種の理化学的性質を有する DNA ポリメラーゼ活性を与える性質を有

するタンパクをいう。

ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能」とは、プローブとともに0.5% SDS、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400、0.01%変性サケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0を示す)中、50℃にて12～20時間インキュベートした後に、プローブとハイブリダイズしていることをいう。

ここで本明細書に記載の「アミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA」なる用語について説明する。遺伝子上でアミノ酸を指定するコドン(3つの塩基の組み合わせ)はアミノ酸の種類ごとに1～6種類ずつが存在することが知られている。したがってあるアミノ酸配列をコードするDNAは、そのアミノ酸配列にもよるが多数存在することができる。遺伝子は自然界において必ずしも安定に存在しているものではなく、その塩基配列に変異が起こることはまれではない。遺伝子上の塩基配列に変異が起こってもそこにコードされたアミノ酸配列には変化を与えない場合(サイレント変異と呼ばれる)もあり、この場合には同じアミノ酸配列をコードする異なる遺伝子が生じたといえる。したがってある特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子が単離されても、それを含有する生物が継代されていくうちに同じアミノ酸配列をコードする多種類の遺伝子ができていく可能性は否定できない。

さらに、同じアミノ酸配列をコードする多種類の遺伝子を人為的に作製することは種々の遺伝子工学的手法を用いれば困難なことではない。たとえば遺伝子工学的なタンパクの生産において、目的のタンパクをコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが宿主中では使用頻度の低いものであった場合にはタンパクの発現量が低いことがある。このような場合にはコードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンが宿主で頻用されているものに人為的に変換することにより、目的タンパクの高発現を図ることが行われている(例えば、特

公平 7-102146 号公報)。このように特定のアミノ酸配列をコードする多種類の遺伝子は、人為的に作製可能なことは言うまでもなく、自然界においても生成されうるものである。したがって本発明中に開示された塩基配列と同一の塩基配列を有する遺伝子ではなくても、それが本発明中に開示されたアミノ酸配列をコードする限り該遺伝子は本発明に包含されるものである。

(3) 本発明の DNA ポリメラーゼの製造方法

本発明者らは、超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサスから新規の DNA ポリメラーゼ遺伝子を見出し、これをクローニングすることによって該遺伝子上に 2 種のタンパク質が共存により活性を示す新規な DNA ポリメラーゼがコードされていることを明らかにした。本発明では、これらの遺伝子を導入した形質転換体を作製して本発明の DNA ポリメラーゼを大量生産することが可能である。この場合、前記のような第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子と、第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子の両方を含有する形質転換体を培養し、培養物から DNA ポリメラーゼを採取する方法でもよく、また、第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体と、第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体とをそれぞれ個別に培養し、培養物中に含まれる DNA ポリメラーゼ構成タンパクを混合することにより DNA ポリメラーゼを採取する方法であってもよい。

ここで、「第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子と、第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子の両方を含有する形質転換体」とは、それぞれの遺伝子を含有する 2 つの発現ベクターで同時形質転換されたものであってもよく、あるいは両方の遺伝子が 1 つの発現ベクターに組み込まれてそれぞれのタンパクが発現できるように調製された形質転換体であってもよい。

(4) 本発明のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング、得られたクローンの解析、発現産物であるDNAポリメラーゼの理化学性質、活性、PCR法への適用などについて、以下に詳細に説明する。

本発明に使用する菌株としては、特に限定されるものではないが、例えば、ピロコッカス属に属する菌株としてピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) DSM 3638 株が挙げられ、該菌株はドイッche ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルチェウレン GmbH より入手可能である。本発明者らは該菌株を適当な増殖培地で培養し、培養物の粗抽出液を調製してポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った場合に、ゲル内でDNAポリメラーゼ活性を示すタンパク質のバンドが数種類存在することを発見したことから、それぞれに対応する遺伝子が存在すると考えられた。即ち、新規DNAポリメラーゼ遺伝子及びその産物は次に例示する工程によりクローニングすることができる。

- ① ピロコッカス フリオサスからDNAを抽出する、
- ② ①のDNAを適当な制限酵素で消化し、プラスミド、コスミドなどをベクターとしてDNAライブラリーを作製する、
- ③ ②で調製したライブラリーを大腸菌に導入し、外来遺伝子を発現させることにより各クローンの粗抽出液を集めたプロテインライブラリーを作製する、
- ④ ③で調製したプロテインライブラリーを用いてDNAポリメラーゼ活性を測定し、活性を有する粗抽出液を与えた大腸菌クローンから外来DNAを取り出す、
- ⑤ 取り出したプラスミドまたはコスミド中に含まれているピロコッカス フリオサスDNA断片を解析し、DNAポリメラーゼ活性を示すタンパク質がコードされている領域を絞っていく、
- ⑥ DNAポリメラーゼ活性を示すタンパク質がコードされていると考えられる

領域の塩基配列を決定し、タンパク質の一次構造を推定する、

⑦ ⑥で推定したタンパク質が大腸菌中でより発現しやすい型になるように発現用プラスミドを構築し、産生されたタンパク質を精製して性質を解析する。

上記DNA供与体であるピロコッカス フリオサスDSM 3638は超好熱性古細菌であり、95℃で嫌気培養する。増殖した菌体を破砕してDNAを抽出、精製する方法、また得られたDNAを制限酵素で切断する方法等は公知の方法を用いる事ができ、当該方法の詳細は1982年コールドスプリングハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ほか著、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 第75～178頁に記載されている。

DNAライブラリーを作製するにあたっては、例えば、トリプルヘリックスコスミドベクター (ストラタジーン社製) を使用することができる。ピロコッカス

フリオサスのDNAをSau3A I (宝酒造社製) で部分消化し、密度勾配遠心分離を行って得られる長鎖のDNA断片を該ベクターのBamH Iサイトにライゲーションし、イン・ビトロ・パッケージングを行う。こうして作製されたDNAライブラリーより得られた形質転換体をそれぞれ個別に培養し、集菌後、超音波処理により菌体を破砕し、熱処理を行って宿主大腸菌の有するDNAポリメラーゼを失活させた後、遠心分離を行って耐熱性タンパクを含む上清を得ることができる。該上清はコスミドプロテインライブラリーと命名され、その一部を用いてDNAポリメラーゼ活性を測定することによりピロコッカス フリオサス由来のDNAポリメラーゼを発現するクローンを得ることができる。DNAポリメラーゼ活性の測定法は公知の方法を用いることができ、当該方法はハーバー アンド ロー社発行、D. R. デービス (D. R. Davis) 編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ (DNA polymerase from Escherichia coli) 第263～276頁 (C. C. リチャードソン著) に記載されている。

ピロコッカス フリオサスのDNAポリメラーゼ遺伝子としてはすでにそのう

ちの一種類を本発明者らがクローニングし、その構造を明らかにしており、ヌクレック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Research) 第 21 巻 259-265 頁 (1993) に記載されている。該遺伝子による翻訳産物は 775 アミノ酸からなる分子量約 90,000 ダルトンのポリペプチドであり、そのアミノ酸配列中には明らかに α 型 DNA ポリメラーゼの保存配列が含まれている。また実際にこの遺伝子産物の示す DNA ポリメラーゼ活性は α 型 DNA ポリメラーゼの特異的阻害剤であるアフディコリンによって阻害されるという性質を有するものであり、本発明の DNA ポリメラーゼとは異なる。したがって、得られた耐熱性 DNA ポリメラーゼ活性を示すクローンの中から上記の既存の遺伝子を除去するには各クロンの含有するコスミドを分解し、上記の遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズしないクローンを選択すればよい。こうして得られた新規な DNA ポリメラーゼ遺伝子を含有するクローンより分解されるコスミドについてその挿入 DNA 断片の制限酵素地図を作製することができる。次に、得られた制限酵素地図をもとに該 DNA 断片を種々の領域に分断し、それぞれをプラスミドベクターにサブクローニングし、大腸菌に導入して発現される耐熱性 DNA ポリメラーゼ活性を測定することによって該 DNA 断片上の DNA ポリメラーゼ遺伝子の位置を調べることができる。こうして DNA ポリメラーゼ遺伝子が含まれる約 10 キロ塩基対の Xba I - Xba I DNA 断片を得ることができる。

該 DNA 断片が組み込まれたプラスミドを有する組換え大腸菌は、その粗抽出液中に 90 °C 20 分間処理後も十分量の DNA 合成活性を有し、該 DNA 断片が組み込まれていないプラスミドはこのような活性を有しないことより、該 DNA 断片上に耐熱性ポリメラーゼ産生情報が存在し、かつ大腸菌内で該情報を有する遺伝子が発現していると結論される。該 DNA 断片が pTV118N ベクター (宝酒造社製) に組み込まれたプラスミドはプラスミド pFU1001 と命名され、また、該プラスミドで形質転換された大腸菌 JM109 は *Escherichia coli*

JM109 / pFU1001 と命名、表示され、平成7年8月11日（原寄託日）より、ブタベスト条約のもと、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）の通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5579として寄託されている。

プラスミドpFU1001に挿入されたDNA断片の塩基配列は通常の方法、たとえばジデオキシ法によって決定することができる。さらに、得られた塩基配列を解析することにより、その塩基配列中のタンパクをコードしうる領域、オープンリーディングフレーム（ORF）を推定することができる。

プラスミドpFU1001に挿入された約10キロ塩基対のXbaI-XbaI DNA断片の塩基配列のうち8450塩基対分の配列を配列表の配列番号5に示す。該塩基配列中には6ケの連続したORFが存在しており、5'側より順にORF1、ORF2、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6と命名されている。図2に上記XbaI-XbaI断片の制限酵素地図、および該断片上に存在するORFの位置を示す（図中左側よりORF1～ORF6）。

上記の6つのORFのどれにもこれまでに知られているDNAポリメラーゼのどれかと相同性を示す配列は見られない。しかしながらORF1とORF2中にはサッカロミセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) で発見されているCDC6タンパク質、またシゾサッカロミセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) で発見されているCDC18タンパク質と相同性のある配列が存在している。CDC6、CDC18は酵母菌において細胞周期のDNA合成期（S期）への移行に必要なタンパク質でDNA複製開始を調節するタンパク質ではないかと予想されている。またORF6は酵母のDNA障害の修復及び体細胞分裂期、減数分裂期の組換えに働くことが知られているRAD51タンパク質とその減数分裂期特異的ホモログであるDmc1タンパク質と相同性がある配列を有している。RAD51タンパク質をコードする遺伝子も細胞周期のG1期からS期に移行するところでその発現が誘導されることが知られている。他のORF3、ORF4、ORF5については相同性のある配列を有する既知のタンパク質は発見さ

れない。

耐熱性DNAポリメラーゼの活性が上記のどのORFに由来するかを、各種領域を欠失させたDNA断片を挿入した組換えプラスミドを作製し、該プラスミドで形質転換した形質転換体の耐熱性ポリメラーゼ活性を測定することにより、調べることができる。上記の約10キロ塩基対のXba I-Xba I DNA断片よりORF 1, ORF 2を欠いたもの、あるいはORF 5, ORF 6を欠いたものを挿入した組換えプラスミドで形質転換された形質転換体は耐熱性DNAポリメラーゼ活性を保持しているが、ORF 3、あるいはORF 4が欠けたものでは活性が失われる。このことからORF 3、あるいはORF 4にDNAポリメラーゼ活性がコードされていることが予想される。

ORF 3, ORF 4のどちらにDNAポリメラーゼがコードされているかは、それぞれのORFを別々に挿入した組換えプラスミドを作製し、得られる形質転換体について耐熱性DNAポリメラーゼ活性の発現を調べることによって調べることができる。意外にも、ORF 3、あるいはORF 4を単独で含む形質転換体のどちらから得られた粗抽出液にもごくわずかのDNAポリメラーゼ活性しか認められない。しかし両抽出液を混合した場合にはORF 3, ORF 4の両方を含む形質転換体と同様の耐熱性DNAポリメラーゼ活性が得られることから、本発明の新規DNAポリメラーゼはこの2つのORFの翻訳産物の働きを必要とするものであることが示される。この2種のタンパクが複合体を形成してDNAポリメラーゼ活性を示すのか、あるいはその一方が他方を修飾して活性型の酵素に変換するのかはDNAポリメラーゼの分子量を測定することによって知ることができる。該DNAポリメラーゼの分子量をゲル濾過法で測定した結果より、上記の2種のタンパクが複合体を形成していることがわかる。

配列表の配列番号2にORF 3の塩基配列、配列番号1に該塩基配列より推定されるORF 3由来の翻訳産物、すなわち第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクのアミノ酸配列をそれぞれ示す。また、配列表の配列番号4にORF 4の塩基

配列、配列番号 3 に該塩基配列より推定される ORF 4 由来の翻訳産物、すなわち第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクのアミノ酸配列をそれぞれ示す。

本発明の DNA ポリメラーゼは ORF 3 および ORF 4 を組み込まれた組換えプラスミドで形質転換された形質転換体、たとえば *Escherichia coli* JM109 / pFU1001 を通常の培養条件、たとえば $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む LB 培地（トリプトン $10 \text{ g}/\text{リットル}$ 、酵母エキス $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、 NaCl $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、 $\text{pH} 7.2$ ）中で培養することにより、その菌体内に発現させることができる。該ポリメラーゼは上記の培養菌体より、たとえば超音波処理、熱処理、および陰イオン交換カラム（RESOURCE Q カラム、ファルマシア社製）、ヘパリンセファロースカラム（HiTrap Heparin、ファルマシア社製）、ゲル濾過カラム（Superose 6 HR、ファルマシア社製）などを用いたクロマトグラフィーを行うことにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）でほぼ 2 種の DNA ポリメラーゼ構成タンパクの 2 本のバンドだけを示すまで精製することができる。また、上記のように ORF 3、ORF 4 をそれぞれ単独で含む形質転換体を個別に培養した後、得られた培養菌体、それらの粗抽出液、あるいは精製された DNA ポリメラーゼ構成タンパクを混合することによっても目的の DNA ポリメラーゼを得ることができる。2 種の DNA ポリメラーゼ構成タンパクを混合する場合には特別な操作は必要なく、それぞれの形質転換体の抽出液、またはそれらから精製された両タンパク質を適量ずつ、単に混ぜ合わせるだけで活性を有する DNA ポリメラーゼを得ることができる。

このようにして得られた本発明の DNA ポリメラーゼは、SDS-PAGE 上で約 $90,000$ ダルトン、約 $140,000$ ダルトンに相当する 2 本のバンドを示し、これらはそれぞれ第 1 および第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクに対応する。

本発明の DNA ポリメラーゼは、図 3 に示されるようにリン酸カリウム緩衝液中、 75°C において $\text{pH} 6.5 \sim 7.0$ 付近に至適 pH を示す。また、該 DNA

ポリメラーゼの酵素活性を種々の温度で測定した場合には75～80℃で高い活性を示すが、これより高い温度では活性測定の基質に用いる活性化DNAの二重鎖構造が破壊されるため、該酵素の活性にとっての正確な至適温度は測定されていない。該DNAポリメラーゼは高い熱安定性を有しており、図4に示されるように80℃、30分間の熱処理の後も80%以上の残存活性を保持している。この熱安定性は該酵素のPCR法での使用を可能にする。また、 α 型DNAポリメラーゼの特異的阻害剤として知られているアフィディコリン (aphidicolin)の影響を調べた場合、該DNAポリメラーゼの活性は2mMのアフィディコリン存在下においても阻害を受けない。

精製されたDNAポリメラーゼの生化学的特性を解析したところ、本発明のDNAポリメラーゼは試験管内で非常に優れたプライマー伸長活性を有している。表1に示されるように一本鎖DNAにプライマーがアニーリングした形の基質 (M13-HT Primer) を用いてDNAポリメラーゼ活性を測定した場合には、通常の活性測定に用いられる活性化DNA (DNase I処理仔牛胸腺DNA) に比べて高いヌクレオチド取り込み活性が得られる。上記のM13-HT Primer 基質を使用して他のDNAポリメラーゼとのプライマー伸長能力の比較を行なうと、本発明のDNAポリメラーゼは既知のピロコッカス フリオサス由来DNAポリメラーゼ (Pfu DNAポリメラーゼ, ストラタジーン社製) やサーマス アクアティカス (Thermus aquaticus) 由来のTaq DNAポリメラーゼ (TaKaRa Taq, 宝酒造社製) に比べて優れた伸長活性を示す。更にこの反応系中に競合基質となる活性化DNAを加えた場合には、上記の2種のDNAポリメラーゼのプライマー伸長活性が強く阻害されるのに対して本発明のDNAポリメラーゼはより軽度の阻害しか受けず、該酵素がプライマー伸長型の基質に高い親和性を持つことが示される (図6)。

表 1

基 質	相 対 活 性		
	本発明の DNA ポリメラーゼ	Pfu DNA ポリメラーゼ	Taq DNA ポリメラーゼ
活性化DNA	100	100	100
熱変性DNA	340	87	130
M13-HT primer	170	23	90
M13-RNA primer	52	0.49	38
poly dA-Oligo dT	94	390	290
poly A-Oligo dT	0.085	—	0.063

また、本発明のDNAポリメラーゼをPCR法に使用した場合には極めて優れた性能を示す。PCR法に繁用されるサーマス アクアティカス由来のDNAポリメラーゼは単独では10キロ塩基対以上のDNA断片を増幅することは困難であり、他のDNAポリメラーゼと組み合わせることによってのみ20キロ塩基対以上のDNA断片を増幅を行なうことができる【プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA (Proceedings of the National Academy of Science of the USA), 第91巻, 第2216-2220頁(1994)]。また、Pfu DNAポリメラーゼを利用して増幅できるDNAの鎖長は最大でも3キロ塩基対程度までと言われている。これに対して本発明のDNAポリメラーゼを使用した場合には、他の酵素の添加なしに該酵素単独で20キロ塩基対のDNA断片の増幅が可能である。

さらに本発明のDNAポリメラーゼは3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が付随しており、DNAポリメラーゼ活性に対するエキソヌクレアーゼ活性の強さは、その活性が強いためにDNA合成の正確性が非常に高いことが知られているP

f u DNAポリメラーゼの活性比に匹敵する(図5)。また、本発明のDNAポリメラーゼについて測定されたDNA合成反応中に起こる誤りの頻度は、Taq DNAポリメラーゼのものよりも低い。上記した種々の性質は本発明のDNAポリメラーゼがPCR法などの遺伝子工学用試薬として非常に優れたものであることを示すものである。

また本発明により新規DNAポリメラーゼ遺伝子が発見されたことは、以下のような興味深い知見も提供する。本発明者らは新規DNAポリメラーゼをコードするORF 3, 4の遺伝子を含む領域が細胞内でどの様に転写されるのかを知るため、ピロコッカス フリオサス細胞より調製したRNA画分をノザンプロット法、RT-PCR法及びプライマー伸長法により分析すると、ORF 1~ORF 6は一つのメッセンジャーRNA(mRNA)としてORF 1のすぐ上流から転写されていることが確認される。この事からORF 1, 2の細胞内での産生はORF 3, 4と同じ制御を受けていると予想され、ORF 1, 2, 5, 6が酵母のDNA複製開始の調節に関与するCDC 6, CDC 18と配列上の相同性があることと考え合わせると本発明の新規DNAポリメラーゼはDNA複製にとって重要なDNAポリメラーゼである可能性が高い。更にピロコッカス フリオサスの属する古細菌のDNA複製系は真核細胞のそれに近いことが予想されるので真核生物ではこれまでにまだ発見されていない複製にとって重要なDNAポリメラーゼとして本発明のDNAポリメラーゼに類似した酵素が存在する事も考えられる。

さらに、本発明のDNAポリメラーゼに類似の耐熱性DNAポリメラーゼは、ピロコッカス フリオサスと同じ超好熱性古細菌に属する細菌、たとえばピロコッカス(Pyrococcus)属に属するピロコッカス フリオサス以外の菌、ピロディクティウム(Pyrodictium)属、サーモコッカス(Thermococcus)属、スタフィロサーマス(Staphylothermus)属等に属する細菌においても生産されていることが期待される。これらの酵素が本発明のDNAポリメラーゼと同様に2つのDNA

ポリメラーゼ構成タンパクより構成されている場合には、これらの酵素のDNAポリメラーゼ構成タンパクの一方と、もう一方のDNAポリメラーゼ構成タンパクに相当する本発明のDNAポリメラーゼ構成タンパクとを組み合わせることによっても同様のDNAポリメラーゼ活性が発現されることが期待される。

上記の超好熱性古細菌の生産する、本発明のDNAポリメラーゼに類似の耐熱性DNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子の塩基配列に関して、本発明のDNAポリメラーゼのアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子の塩基配列との間に相同性が存在することが期待される。したがって本発明により単離された遺伝子、もしくはその塩基配列の一部をプローブとしたハイブリダイゼーションによって上記の好熱性古細菌より得られたDNA断片を適当な微生物に導入し、前記のコスミドプロテインライブラリーと同様の方法で調製した熱処理ライゼート中のDNAポリメラーゼ活性を適当な方法で調べることにより、本発明のDNAポリメラーゼの塩基配列と同一ではないが同様の酵素活性を持つ本酵素類似の耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を得ることができる。

上記のハイブリダイゼーションは以下の条件で行うことができる。すなわち、DNAを固定したメンブレンを0.5% SDS、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC (1×SSCは0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0を示す) 中で、50℃にて12～20時間、プローブとともにインキュベートする。インキュベート終了後、0.5% SDSを含む2×SSC中、37℃での洗浄から始めて、SSC濃度は0.1×までの範囲で、また、温度は50℃までの範囲で変化させ、固定されたDNA由来のシグナルがバックグラウンドと区別できるようになるまで洗浄する。

さらに、本発明により単離された遺伝子、もしくはその塩基配列の一部をプライマーに用い、上記の好熱性古細菌より得られたDNAを鋳型とした遺伝子増幅

反応で得られたDNA断片、あるいは該断片をプローブとしたハイブリダイゼーションによって上記の好熱性古細菌より得られたDNA断片を適当な微生物に導入し、上記と同様にDNAポリメラーゼ活性を調べることにより、本発明のDNAポリメラーゼの活性と同一ではないが、同様の活性を持つ、本酵素類似的耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を得ることができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。なお、実施例中の％は重量％を意味する。

実施例 1

(1) ピロコッカス フリオサスのゲノムDNAの調製

ピロコッカス フリオサスDSM3638の培養は以下のとおりに行った。

トリプトン1％、酵母エキス0.5％、可溶性デンプン1％、ジャマリンS・ソリッド（ジャマリンラボラトリー社製）3.5％、ジャマリンS・リキッド（ジャマリンラボラトリー社製）0.5％、MgSO₄ 0.003％、NaCl 0.001％、FeSO₄・7H₂O 0.0001％、CoSO₄ 0.0001％、CaCl₂・7H₂O 0.0001％、ZnSO₄ 0.0001％、CuSO₄・5H₂O 0.1ppm、KAl(SO₄)₂ 0.1ppm、H₃BO₃ 0.1ppm、Na₂MoO₄・2H₂O 0.1ppm、NiCl₂・6H₂O 0.25ppmの組成の培地を2リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み、溶存酵素を除去した後、これに上記菌株を接種して95℃、16時間静置培養した。培養後、遠心分離によって菌体を集めた。

つぎに、集菌体を25％スクロースを含む0.05Mトリス-HCl（pH8.0）4mlに懸濁し、この懸濁液に0.8mlのリゾチーム[5mg/ml、0.25Mトリス-HCl（pH8.0）]、2mlの0.2M EDTAを加えて、20℃で1時間保温した後、24mlのSET溶液[150mM NaC

1、1mM EDTA、20mMトリス-HCl (pH 8.0)]を加え、さらに、5% SDS 4ml、プロテイナーゼK (10mg/ml) 400 μ lを加え、37°C、1時間反応させた。反応終了後、フェノールクロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約3.2mgのゲノムDNAを調製した。

(2) コスミドプロテインライブラリーの作製

ピロコッカス フリオサスDSM 3638のゲノムDNA 400 μ gをSau 3A Iで部分消化し、密度勾配超遠心法により、35~50kbにサイズ分画した。つぎに、トリプルヘリックスコスミドベクター (ストラタジーン社製) 1 μ gをXba I消化した後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を用いて脱リン酸化し、さらに、BamH I消化して上記の分画された35~50kbのDNA 140 μ gと混合してライゲーションを行い、ガイガーバック・ゴールド (ストラタジーン社製) を用いたイン・ビトロ・パッケージング法によってピロコッカス フリオサスのゲノムDNAのフラグメントをラムダファージ粒子中にパッケージングし、ライブラリーを調製した。ついで、得られたライブラリーの一部を用いてイー・コリDH5 α MCRに形質導入し、得られた形質転換体のうち数個を選んでコスミドDNAを調製し、適当な大きさの挿入断片があることを確認したのち、改めて、上記のライブラリー中から約500個の形質転換体を選び、それぞれ別個に100 μ g/mlのアンピシリンを含む150mlのLB培地 (トリプトン10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaClの5g/リットル、pH 7.2) 中で培養した。該培養物を遠心し、回収した菌体を20mMトリス-HCl、pH 8.0 1mlに懸濁し、100°Cで10分間熱処理した。続いて超音波処理を行い、さらに、もう一度100°C、10分間熱処理した。遠心後の上清として得られるライゼートをコスミドプロテインライブラリーとした。

(3) DNAポリメラーゼ活性の測定

DNAポリメラーゼ活性測定には仔牛胸腺DNA（ワージントン社製）をDNase I 処理によって活性化したもの（活性化DNA）を基質として用いた。DNAの活性化およびDNAポリメラーゼ活性の測定は、ハーバー アンド ロー社発行、D. R. デービス (D. R. Davis) 編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ (DNA polymerase from *Escherichia coli*) 第263-276頁 (C. C. リチャードソン著) に記載の方法で行った。

酵素活性測定は以下の方法で行った。すなわち、活性を測定しようとする試料を含む反応液 [20 mM トリス-塩酸 (pH 7.7), 15 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 0.2 mg/ml 活性化DNA, 40 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 60 nM [3H] dTTP (アマシャム社製)] 50 μ l を調製し、75°Cで15分間反応させた。そのうちの40 μ l をDEペーパー (ワットマン社製) にスポットし、5% Na_2HPO_4 で洗浄を5回行った後にDEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。上記の酵素活性測定方法によって30分間あたりに10 nmol の [3H] dTMP を基質DNAに取り込む酵素量を酵素1単位とした。

(4) DNAポリメラーゼ遺伝子を含むコスミドクローンの選択

反応溶液として20 mM トリス-塩酸 (pH 7.7), 2 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 0.2 mg/ml 活性化DNA, 40 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 60 nM [3H] dTTP (アマシャム社製) を用意し、この溶液45 μ l に対してコスミドプロテインライブラリーの各抽出液より1 μ l を5クローンずつ、即ち5 μ l を1反応分として加え、75°Cで15分反応させた後、各40 μ l 分をDEペーパーにスポットし、5% Na_2HPO_4 で洗浄を5回行い、DEペーパー上に残っている放射活性を液

体シンチレーションカウンターで測定した。5 クローンを1 グループとした一次測定により活性が認められたグループは、続いて5 クローンを1 クローンずつに分け二次測定を行った。コスミドDNAライブラリー中に既知のDNAポリメラーゼ遺伝子を含むものは予め該遺伝子をプローブとしたハイブリダイゼーションテストより、クローンNo. 57, 154, 162, 363であることが分かっていることから、これら以外のクローンでDNA合成活性を含むクローンとしてNo. 41, 153, 264, 462, 491の5 クローンが発見された。

(5) 制限酵素地図の作製

上記の5 クローンについてコスミドを分離し、それぞれをBamHIで分解してその泳動パターンを調べてみると互いに共通するバンドが何本か見られ、この5 クローンはオーバーラップしながらすこしずつずれた領域を組込んでいることが予想された。そこでクローンNo. 264と491の挿入DNA断片について制限酵素地図を作製した。両クローンから調製したコスミドを各種制限酵素で切断した結果、適当な大きさの断片に切断されたKpnI, NotI, PstI, SmaI, XbaI, XhoI (いずれも宝酒造社製) についてそれぞれ切断位置を決定した結果、図1に示すような地図が得られた。

(6) DNAポリメラーゼ遺伝子のサブクローニング

図1に示した制限酵素地図をもとにクローン264あるいは491由来のコスミドより10キロ塩基対前後の種々のDNA断片を切り出し、pTV118NまたはpTV119Nベクター (宝酒造社製) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミドによる形質転換体について耐熱性DNAポリメラーゼ活性を測定した結果、約10キロ塩基対のXbaI-XbaI断片に強い耐熱性DNAポリメラーゼを産生する遺伝子があることが判明した。そこで該XbaI-XbaI断片がpTV118Nベクターに組み込まれたものをプラスミドpFU100

1 と命名し、該プラスミドで形質転換された大腸菌 JM109 を *Escherichia coli* JM109 / pFU1001 と命名した。

実施例 2

新規 DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列の決定

実施例 1 で得られたプラスミド pFU1001 より DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む上記 Xba I - Xba I 断片をもう一度 Xba I で切り出し、DNA ブランディングキット（宝酒造社製）を用いて平滑末端化した後、新たな pTV118N ベクターを Sma I で開環したものと連結して欠損変異体作製用プラスミドを調製し、挿入断片の方向性によってそれぞれ pFU1002, pFU1003 と命名した。これらプラスミドを用いて挿入 DNA 断片の両端から順次欠損変異体を作製した。作製には Henikoff の方法（ジーン（Gene）第 28 巻、第 351 - 359 頁）を応用した Kilo-Sequence 用 Deletion kit（宝酒造社製）を利用した。3' 突出型、5' 突出型制限酵素としてはそれぞれ Pst I, Xba I を利用した。得られた種々の欠損変異体を鋳型として BcaBEST ジデオキシシーケンスキット（宝酒造社製）を用いたジデオキシ法により挿入断片の塩基配列を決定した。

配列表の配列番号 5 に得られた塩基配列のうち 8450 塩基対分の配列を示す。該塩基配列を解析した結果、タンパクをコードしうる 6 つのオープンリーディングフレーム（ORF）が見い出され、配列表の配列番号 5 に示される塩基配列の塩基番号 123 - 614（ORF1）、611 - 1381（ORF2）、1384 - 3222（ORF3）、3225 - 7013（ORF4）、7068 - 7697（ORF5）、7711 - 8385（ORF6）の位置にそれぞれ存在していた。図 2 にプラスミド pFU1001 に組み込まれた約 10 キロ塩基対の Xba I - Xba I DNA 断片の制限酵素地図、および該断片上の上記の ORF の位置を示す。

また、上記の種々の欠損変異体を用いて耐熱性DNAポリメラーゼ活性を測定したところ、上流から欠損させても下流から欠損させてもORF 3およびORF 4の領域まで欠損がおよぶとDNAポリメラーゼ活性が失なわれることが示された。これよりORF 3およびORF 4の翻訳産物がDNAポリメラーゼ活性の発現に重要であることが示された。配列表の配列番号2にORF 3の塩基配列、配列番号1に該塩基配列から推定されるORF 3の翻訳産物のアミノ酸配列をそれぞれ示す。また、配列表の配列番号4にORF 4の塩基配列、配列番号3に該塩基配列から推定されるORF 4の翻訳産物のアミノ酸配列をそれぞれ示す。

実施例 3

精製DNAポリメラーゼ標品の調製

実施例1で得られた *Escherichia coli* JM109 / pFU1001 をアンピシリンが $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在するLB培地（トリプトン $10 \text{ g}/\text{リットル}$ 、酵母エキス $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、NaCl $5 \text{ g}/\text{リットル}$ 、pH 7.2） 500 ml で培養した。培養液の濁度が 0.6 A_{600} に達した時、誘導物質であるイソプロピル- β -D-チオガラクトシド（IPTG）を添加し、さらに16時間培養を行った。集菌後、菌体を 37 ml のソニケーションバッファー（ 50 mM トリス塩酸、pH 8.0、 2 mM 2-メルカプトエタノール、 10% グリセロール、 2.4 mM PMSF（フェニルメタンスルフォニルフルオリド））に懸濁し、超音波破碎機にかけた。 12000 rpm 、10分の遠心分離により 42 ml の粗抽出液を上清として回収し、これを 80°C 、15分間の熱処理にかけた。その後再度 12000 rpm 、10分の遠心分離を行って 33 ml の熱処理酵素液を得た。次にこの溶液をバッファーA（ 50 mM リン酸カリウム、pH 6.5、 2 mM 2-メルカプトエタノール、 10% グリセロール） 800 ml を外液として2時間×4回透析した。透析後の酵素液 32 ml をバッファーAで平衡化したRESOURCE Qカラム（ファルマシア社製）に供し、FPLCシステム（ファルマシ

ア社製)を用いてクロマトグラフィーを行った。展開は0→500mMのNaCl直線濃度勾配により行った。DNAポリメラーゼ活性は340mM NaClのところ溶出された。

活性のある画分を集めて得られた10mlの酵素溶液を限外濾過により脱塩、濃縮し、バッファーA+150mM NaClに溶解した3.5mlの酵素溶液とし、同じバッファーで平衡化したHi Trap Heparin カラム(ファルマシア社製)に供した。FPLCシステムを用いて150→650mM NaCl直線濃度勾配により展開し、400mM NaClのところ溶出された活性画分を得た。この画分5mlを限外濾過により脱塩、濃縮を繰り返し、120 μ lの50mMリン酸カリウム、pH6.5、2mM 2-メルカプトエタノール、75mM

NaCl溶液にまで濃縮した。この溶液を同じバッファーで平衡化した Superose 6ゲル濾過カラム(ファルマシア社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、DNAポリメラーゼ活性は保持時間34.7分および38.3分の位置に溶出された。同一条件での分子量マーカーの溶出位置との比較の結果より、これらの活性はそれぞれ約385キロダルトン、約220キロダルトンの分子量を持つと予想された。これらの分子量はORF3の翻訳産物とORF4の翻訳産物とが1:2のモル比で複合体を形成した場合、および1:1のモル比で複合体を形成した場合に相当する。しかしながら高分子量になるほど分子量の測定誤差が大きくなることから、前者については2種の翻訳産物が2:2のモル比で複合体を形成している可能性も否定できない。

実施例4

(1) DNAポリメラーゼの生化学的特性

実施例3で得られた、ORF3とORF4の翻訳産物、すなわち第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクと第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクとが1:1で複合体を形成したDNAポリメラーゼ標品について、まず至適MgCl₂およ

びKCl濃度を求めた。反応系は20mMトリス塩酸、pH7.7, 2mM 2-メルカプトエタノール, 0.2mg/ml活性化DNA, 40 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTPに2mM MgCl₂の存在下で0~200mMの範囲で20mMずつKCl濃度を上げていき、DNAポリメラーゼ活性を測定した。その結果、KClは60mMのとき最大活性を示した。次に上記反応系に60mMKClの存在下、今度はMgCl₂を0.5~25mMまで2.5mM毎に比較したところ10mMで最大活性を示したが、KClを含まない場合と比較してみるとその場合は17.5mMで最大活性を示した。

次に至適pHを調べた。各種pHのリン酸カリウム緩衝液を用い、20mMリン酸カリウム, 15mM MgCl₂, 2mM 2-メルカプトエタノール, 0.2mg/ml活性化DNA, 40 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 60nM [³H] dTTPからなる反応液を調製し、これを用いて75°CでDNAポリメラーゼ活性を測定した。図3にその結果を示す。図中横軸はpH、縦軸は高分子DNAに取り込まれた放射活性を示す。図に示されるように本発明のDNAポリメラーゼはpH6.5~7.0で最大活性を示した。リン酸カリウムにかえてトリス塩酸を用いた場合にはアルカリ側にいくほど活性が高く、測定に用いた最も高いpHであるpH8.02で最大の活性を示した。

本発明のDNAポリメラーゼの熱安定性を以下のようにして調べた。精製されたDNAポリメラーゼを20mMトリス塩酸(pH7.7), 2mM 2-メルカプトエタノール, 10%グリセリン, 0.1%ウシ血清アルブミン溶液として調製し、種々の温度で30分間保温した後、残存するDNAポリメラーゼ活性を測定した。図4にその結果を示す。図中横軸は保温温度、縦軸は残存活性を示す。図に示されるように本酵素は80°C、30分間の熱処理の後も80%以上の残存活性を保持していた。

インヒビターの阻害様式を比較するため、 α 型DNAポリメラーゼの特異的阻害剤であるアフィディコリン(aphidicolin)を用いてすでに知られているピロコ

ッカス フリオサス由来の α 型DNAポリメラーゼ (Pfu DNAポリメラーゼ、ストラタジーン社製) といっしょに阻害のされ方を比べた。20mMトリス塩酸、pH 7.7, 15mM MgCl₂, 2mM 2-メルカプトエタノール, 0.2mg/ml 活性化DNA, 40 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP存在下でアフィディコリンを0~2.0mMまで増やしていき、活性の変化を調べたところ、Pfu DNAポリメラーゼは1.0mMで20%まで活性が減少するのに対して本発明の新規DNAポリメラーゼは2.0mMでも全く阻害されなかった。

(2) プライマー伸長反応

次に本発明のDNAポリメラーゼの基質DNAの形に対する選択性を比較するため、以下の様な鋳型-プライマーについて調べた。通常の活性測定に用いられる活性化DNAの他、活性化DNAを85℃ 5分間処理して熱変性させたもの (熱変性DNA)、M13ファージ一本鎖DNA (M13mp18ssDNA、宝酒造社製) に配列表の配列番号6に示す配列の45塩基の合成デオキシリボオリゴヌクレオチドをプライマーとしてアニーリングさせたもの (M13-HT Primer)、同じくM13ファージ一本鎖DNAに配列表の配列番号7に示す配列の17塩基の合成リボオリゴヌクレオチドをプライマーとしてアニーリングさせたもの (M13-RNA Primer)、ポリデオキシアデノシン (PolydA, ファルマシア社製) とオリゴデオキシチミジン (OligodT, ファルマシア社製) を20:1のモル比で混合したもの (PolydA-OligodT)、ポリアデノシン (PolyA, ファルマシア社製) とオリゴデオキシチミジンを20:1のモル比で混合したもの (PolyA-OligodT) を基質として調製した。

これらの基質を活性化DNAのかわりに用いてDNAポリメラーゼ活性を測定し、活性化DNAを基質に用いた場合に得られる活性を100とした時の各基質での相対活性を表1に示す。比較のためにPfu DNAポリメラーゼ、サーマ

ス アクアティカス由来のTaq DNAポリメラーゼ (TaKaRa Taq, 宝酒造社製) についても同様に調べた。表1に示されるように本発明の新規DNAポリメラーゼは他のDNAポリメラーゼと比較すると活性化DNAを基質とした場合よりもM13-HT Primer を用いて得られる活性の方が高く、プライマー伸長反応に対し特に高い適性を有していた。

さらにプライマー伸長活性について詳細な検討を行った。基質としてM13-HT Primer を用い、プライマーの5'-末端を [γ - 32 P] ATP (アマシャム社製) とT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) によって標識したうえで使用した。終濃度0.05 μ g/ μ lの上記基質と、活性化DNAを基質とした活性測定で0.05単位を示す量の各種DNAポリメラーゼを含む10 μ lの反応液 (20 mM トリス-塩酸 (pH 7.7), 15 mM MgCl₂, 2 mM 2-メルカプトエタノール, 270 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP) を調製し、75°Cで1, 2, 3, 4分間反応させた。反応終了後、2 μ lの反応停止液 (95%ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05%プロモフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール) を加えて95°C、3分間の熱変性処理後、反応液のうち2 μ lを8M尿素を含むポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、オートラジオグラムを作製した。また、競合基質となる活性化DNA存在下での伸長活性を調べるため、上記の反応液に終濃度0.4 μ g/ μ lの活性化DNAを加えたものを準備し、上記同様に操作してオートラジオグラムを作製した。得られたオートラジオグラムを図6に示す。

図中、Pol, Pfu, Taqはそれぞれ本発明のDNAポリメラーゼ, Pfu DNAポリメラーゼ, Taq DNAポリメラーゼについて得られた結果を示し、1, 2, 3, 4はそれぞれ反応時間 (分) を示す。また、図中-, +の表示はそれぞれ活性化DNA非存在下、および存在下で得られた結果を示す。さらに図中左端のG, A, T, Cで示されたレーンは上記と同じ基質を用いたジデオキシ法による鎖停止反応で得られた反応物を泳動したものであり、伸長産物の長さを

推定するのに使用した。図に示されるように本発明のDNAポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼに比べてより優れたプライマー伸長活性を示した。また、活性化DNA非存在下では比較的高いプライマー伸長活性を示すTaq DNAポリメラーゼが大過剰量の活性化DNAの添加によって顕著に阻害されるのに対し、本発明のDNAポリメラーゼは活性化DNAによる阻害を受けにくいことが示された。このことから本発明のDNAポリメラーゼが、特に一本鎖の鑄型DNAにプライマーがひとつアニーリングした形のプライマー伸長型の基質に対して高い親和性を有していることが確かめられた。

(3) 付随するエキソヌクレアーゼ活性の有無

本発明のDNAポリメラーゼに付随するエキソヌクレアーゼ活性を以下のようにして調べた。5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性検出用基質として、pUC119ベクター（宝酒造社製）をSsp I（宝酒造社製）で消化して得られる386塩基対のDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離した後、精製し、[γ - 32 P] ATPとポリヌクレオチドキナーゼを用いて5' -末端が 32 Pで標識されたDNA断片を調製した。また3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性検出用基質としてpUC119ベクターをSau 3 A Iで消化して得られる341塩基対のDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離した後、精製し、[γ - 32 P] CTP（アマシャム社製）とクレノウフラグメント（宝酒造社製）を用いた fill-in 反応により3' -末端が 32 P標識されたDNA断片を調製した。標識DNAはN1CKカラム（ファルマシア社製）でゲル濾過して精製し、以下の反応に用いた。これらの標識DNA 1 ngを含む反応液（20 mM トリス-塩酸（pH 7.7）、15 mM MgCl₂、2 mM 2-メルカプトエタノール）に0.015単位のDNAポリメラーゼを加えて75℃で2.5、5、7.5分間反応させた後、エタノールを加えてDNAを沈殿させた。上清中に存在する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、エキソヌクレアーゼ活性による分解量を

求めた。本発明のDNAポリメラーゼには $5' \rightarrow 3'$ エキソヌクレアーゼ活性は認められなかったが強い $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性を持つことが示された。 $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性が強いことが知られているPfuDNAポリメラーゼを用いて同様にして $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性を測定し、これらの結果を合わせて図5に示す。

図中横軸は反応時間を、縦軸は反応液全体に含まれる放射活性に対する上清に遊離した放射活性の割合を示す。また図中白丸は本発明のDNAポリメラーゼ、黒丸はPfuDNAポリメラーゼについて得られた結果を示す。図に示されるように本発明のDNAポリメラーゼは $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性が強いためにDNA合成の忠実度が高いことが知られているPfuDNAポリメラーゼと同程度の $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性を有することが示された。

(4) DNA合成反応の正確性の比較

DNAポリメラーゼによるDNA合成反応の正確性を、pUC118ベクター（宝酒造社製）の一部を一本鎖化したもの（ギャップ形成二本鎖プラスミド）を鋳型として調べた。一本鎖pUC118は大腸菌MV1184（宝酒造社製）を宿主とし、ヘルパーファージM13KO7（宝酒造社製）を用いて、1989年コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス（T. Maniatis）ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル 第2版（Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.）4. 44～4. 48に記載の方法で調製した。また二本鎖DNAはpUC118ベクターをPvuII（宝酒造社製）消化した後にアガロースゲル電気泳動を行い、約2.8キロ塩基対のDNA断片を回収して調製した。

上記の一本鎖DNA $1 \mu\text{g}$ と、二本鎖DNA $2 \mu\text{g}$ とを混合して $180 \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水溶液とし、 70°C 、10分間保温した後、 $20 \mu\text{l}$ の $20\times\text{SSC}$ を加えてさらに 60°C 、10分間静置した。エタノール沈殿を行ってDNAを回収

し、その一部をアガロースゲル電気泳動に供してギャップ形成二本鎖プラスミドが得られていることを確認した。得られたギャップ形成二本鎖プラスミドのうち、1/10量を含む30 μ lの反応液(10mM トリス-HCl、pH8.5、50mM KCl、10mM MgCl₂、1mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)を調製し、これを70℃で3分間保温した後、0.5単位のDNAポリメラーゼを加えて70℃、10分間のDNA合成反応を行った。反応終了後、反応液のうち10 μ lを用いて大腸菌DH5 α (BRL社製)を形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリン、0.1mMのIPTG、40 μ g/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシドを含むLBプレート上で37℃、18時間培養した。プレート上に出現した白色、および青色のコロニーの数を調べ、DNA合成時に誤りが起こっている白色コロニーの出現率を算出した。その結果、DNAポリメラーゼとしてTaqDNAポリメラーゼを用いた場合の出現率(%)は、3.18%であったのに対し、本発明のDNAポリメラーゼを用いた場合には、出現率が1.61%とそれよりも低い値を示した。

(5) PCRへの利用

本発明のDNAポリメラーゼのPCR反応における性能をTaqDNAポリメラーゼと比較するために λ -DNAを鋳型としたPCR反応を行った。本発明のDNAポリメラーゼ用の反応液組成は10mMトリス-塩酸(pH9.2)、3.5mM MgCl₂、75mM KCl、400 μ M dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%トリトンX-100(Triton X-100)とし、TaqDNAポリメラーゼ用の反応液組成は10mMトリス-塩酸(pH8.3)、1.5mM MgCl₂、50mM KCl、400 μ M dATP、dCTP、dGTP、dTTPとし、5.0ng/50 μ l λ -DNA(宝酒造社製)10pmole/50 μ l プライマー

λ 1、およびプライマーλ 1 1、3. 7単位/50 μ l DNAポリメラーゼを含む反応液50 μ lを調製した。プライマーλ 1、およびプライマーλ 1 1の塩基配列を配列表の配列番号8、および配列番号9にそれぞれ示す。上記の反応液について98℃、10秒～68℃、10分を1サイクルとした30サイクルのPCR反応を行った後、反応液のうちの5 μ lをアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色によって増幅されたDNA断片を確認した。この結果、Taq DNAポリメラーゼを用いたものではDNA断片の増幅が認められないのに対し、本発明のDNAポリメラーゼでは約20キロ塩基対のDNA断片の増幅が確認された。

次に、プライマーをプライマーλ 1、及びプライマーλ 1 0に変更して実験を行った。プライマーλ 1 0の塩基配列を配列表の配列番号10に示す。上記同様の反応液組成で2.5 ngのλ-DNA、10 pmoleのプライマーλ 1、及びプライマーλ 1 0、3.7単位のDNAポリメラーゼを含む25 μ lの反応液を調製し、上記同様の反応条件で5サイクル反応させた後、反応液のうちの5 μ lをアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行なうと、Taq DNAポリメラーゼでは特異的な増幅が見られないのに対し、本発明のDNAポリメラーゼでは約15キロ塩基対のDNA断片が増幅していることが示された。

実施例 5

(1) ORF 3 翻訳産物のみを発現するためのプラスミドの構築

実施例2に記載のプラスミドpFU1002（該プラスミドにはベクター上のlacプロモーター下流にORF1～ORF6が位置している）をもとにその挿入DNA断片のうちORF3直後より下流部分を欠失させて作製した変異体プラスミド6-82を鋳型とし、プライマーM4（宝酒造社製）、および配列表の配列番号11にその塩基配列を示すプライマーNO3を用いたPCR反応を行った。なおPCR反応に使用するDNAポリメラーゼには合成反応の正確性が高いP

f u DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）を用いた。1 ngの鑄型DNA、25 pmolずつの両プライマー、および2.5単位のPfu DNAポリメラーゼを含む100 μ lのPCR反応液[20 mM トリス-HCl、pH 8.2、10 mM KCl、20 mM MgCl₂、6 mM (NH₄)₂SO₄、0.2 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、1% トリトンX-100、0.01% BSA]を調製し、94°C、0.5分～55°C、0.5分～72°C、2分を1サイクルとした25サイクルの反応を行った。増幅された約2キロ塩基対のDNA断片をNcoI、SphI（ともに宝酒造社製）で消化した後、pTV118Nベクター（宝酒造社製）のNcoI-SphIサイト間に組み込んだプラスミドpFU-ORF3を作製した。該プラスミドの挿入DNA断片はORF3のみを翻訳可能な状態で含んでいる。

(2) ORF4 翻訳産物のみを発現するためのプラスミドの構築

上記のプラスミドpFU1002をもとにその挿入DNA断片のうちORF4中央部より下流部分を欠失させて作製した変異体プラスミド6-2を鑄型とし、プライマーM4、および配列表の配列番号12にその塩基配列を示すプライマーNO4を用いたPCR反応を行った。鑄型DNAをプラスミド6-2に、またプライマーNO3をプライマーNO4にそれぞれ変更した他は上記の実施例5-(1)と同じ条件で反応を行った。増幅されたDNA断片をNcoI、NheI（宝酒造社製）で消化して得られる約1.6キロ塩基対のDNA断片を、上記のプラスミドpFU1002より単離される約3.3キロ塩基対のNheI-SalI断片（ORF4の後半部分を含む）とともにpET15bベクター（ノバジェン社製）のNcoI-XhoIサイトに組み込んだプラスミドpFU-ORF4を作製した。該プラスミドの挿入DNA断片はORF4のみを翻訳可能な状態で含んでいる。

(3) ORF 3、ORF 4 翻訳産物からのDNAポリメラーゼの再構成

上記のプラスミド pFU-ORF 3 で形質転換された大腸菌 JM109、Escherichia coli JM109/pFU-ORF 3、および上記のプラスミド pFU-ORF 4 で形質転換された大腸菌 HMS174、Escherichia coli HMS174/pFU-ORF 4 をそれぞれ個別に培養し、菌体中に発現された両 ORF の翻訳産物を精製した。形質転換体の培養、および粗抽出液の調製は実施例 3 に記載の方法によった。また両翻訳産物の精製は RESOURCE Q、HiTrap Heparin、Superose 6 などのカラムを用い、SDS-PAGE 上で翻訳産物の挙動を確認することによって行った。こうして精製された両 ORF の翻訳産物はどちらも単独では DNA ポリメラーゼ活性を示さなかったが、この 2 つを混合した場合には耐熱性の DNA ポリメラーゼ活性が出現することが確認された。

産業上の利用可能性

本発明により、高いプライマー伸長性と 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性とを合わせ持つ新規な DNA ポリメラーゼが提供される。該酵素は PCR 法への利用に適しており、遺伝子工学研究用試薬として有用である。また、本発明の DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的な該酵素の製造も可能となった。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 613

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Met Asp Glu Phe Val Lys Ser Leu Leu Lys Ala Asn Tyr Leu Ile		
	5	10 15
Thr Pro Ser Ala Tyr Tyr Leu Leu Arg Glu Tyr Tyr Glu Lys Gly		
	20	25 30
Glu Phe Ser Ile Val Glu Leu Val Lys Phe Ala Arg Ser Arg Glu		
	35	40 45
Ser Tyr Ile Ile Thr Asp Ala Leu Ala Thr Glu Phe Leu Lys Val		
	50	55 60
Lys Gly Leu Glu Pro Ile Leu Pro Val Glu Thr Lys Gly Gly Phe		
	65	70 75
Val Ser Thr Gly Glu Ser Gln Lys Glu Gln Ser Tyr Glu Glu Ser		
	80	85 90
Phe Gly Thr Lys Glu Glu Ile Ser Gln Glu Ile Lys Glu Gly Glu		
	95	100 105
Ser Phe Ile Ser Thr Gly Ser Glu Pro Leu Glu Glu Glu Leu Asn		
	110	115 120
Ser Ile Gly Ile Glu Glu Ile Gly Ala Asn Glu Glu Leu Val Ser		
	125	130 135

Asn Gly Asn Asp Asn Gly Gly Glu Ala Ile Val Phe Asp Lys Tyr		
140	145	150
Gly Tyr Pro Met Val Tyr Ala Pro Glu Glu Ile Glu Val Glu Glu		
155	160	165
Lys Glu Tyr Ser Lys Tyr Glu Asp Leu Thr Ile Pro Met Asn Pro		
170	175	180
Asp Phe Asn Tyr Val Glu Ile Lys Glu Asp Tyr Asp Val Val Phe		
185	190	195
Asp Val Arg Asn Val Lys Leu Lys Pro Pro Lys Val Lys Asn Gly		
200	205	210
Asn Gly Lys Glu Gly Glu Ile Ile Val Glu Ala Tyr Ala Ser Leu		
215	220	225
Phe Arg Ser Arg Leu Lys Lys Leu Arg Lys Ile Leu Arg Glu Asn		
230	235	240
Pro Glu Leu Asp Asn Val Val Asp Ile Gly Lys Leu Lys Tyr Val		
245	250	255
Lys Glu Asp Glu Thr Val Thr Ile Ile Gly Leu Val Asn Ser Lys		
260	265	270
Arg Glu Val Asn Lys Gly Leu Ile Phe Glu Ile Glu Asp Leu Thr		
275	280	285
Gly Lys Val Lys Val Phe Leu Pro Lys Asp Ser Glu Asp Tyr Arg		
290	295	300
Glu Ala Phe Lys Val Leu Pro Asp Ala Val Val Ala Phe Lys Gly		
305	310	315
Val Tyr Ser Lys Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Asn Lys Phe Tyr Leu		
320	325	330

Pro Asp Val Pro Leu Tyr Arg Arg Gln Lys Pro Pro Leu Glu Glu			
	335	340	345
Lys Val Tyr Ala Ile Leu Ile Ser Asp Ile His Val Gly Ser Lys			
	350	355	360
Glu Phe Cys Glu Asn Ala Phe Ile Lys Phe Leu Glu Trp Leu Asn			
	365	370	375
Gly Asn Val Glu Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ile Val Ser Arg Val			
	380	385	390
Lys Tyr Leu Ile Ile Ala Gly Asp Val Val Asp Gly Val Gly Val			
	395	400	405
Tyr Pro Gly Gln Tyr Ala Asp Leu Thr Ile Pro Asp Ile Phe Asp			
	410	415	420
Gln Tyr Glu Ala Leu Ala Asn Leu Leu Ser His Val Pro Lys His			
	425	430	435
Ile Thr Met Phe Ile Ala Pro Gly Asn His Asp Ala Ala Arg Gln			
	440	445	450
Ala Ile Pro Gln Pro Glu Phe Tyr Lys Glu Tyr Ala Lys Pro Ile			
	455	460	465
Tyr Lys Leu Lys Asn Ala Val Ile Ile Ser Asn Pro Ala Val Ile			
	470	475	480
Arg Leu His Gly Arg Asp Phe Leu Ile Ala His Gly Arg Gly Ile			
	485	490	495
Glu Asp Val Val Gly Ser Val Pro Gly Leu Thr His His Lys Pro			
	500	505	510
Gly Leu Pro Met Val Glu Leu Leu Lys Met Arg His Val Ala Pro			
	515	520	525

Met Phe Gly Gly Lys Val Pro Ile Ala Pro Asp Pro Glu Asp Leu		
	530	535 540
Leu Val Ile Glu Glu Val Pro Asp Val Val His Met Gly His Val		
	545	550 555
His Val Tyr Asp Ala Val Val Tyr Arg Gly Val Gln Leu Val Asn		
	560	565 570
Ser Ala Thr Trp Gln Ala Gln Thr Glu Phe Gln Lys Met Val Asn		
	575	580 585
Ile Val Pro Thr Pro Ala Lys Val Pro Val Val Asp Ile Asp Thr		
	590	595 600
Ala Lys Val Val Lys Val Leu Asp Phe Ser Gly Trp Cys		
	605	610

配列番号 : 2

配列の長さ : 1839

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

ATGGATGAAT TTGTAAAATC ACTTCTAAAA GCTAACTATC TAATAACTCC CTCTGCCTAC	60
TATCTCTTGA GAGAATACTA TGAAAAAGGT GAATTCTCAA TTGTGGAGCT GGTAATAATT	120
GCAAGATCAA GAGAGAGCTA CATAATTACT GATGCTTTAG CAACAGAATT CCTTAAAGTT	180
AAAGGCCTTG AACCAATTCT TCCAGTGGAA ACAAAGGGGG GTTTTGTTC CACTGGAGAG	240
TCCCAAAAAG AGCAGTCTTA TGAAGAGTCT TTTGGGACTA AAGAAGAAAT TTCCCAGGAG	300
ATTAAAGAAG GAGAGAGTTT TATTTCCACT GGAAGTGAAC CACTTGAAGA GGAGCTCAAT	360

AGCATTGGAA TTGAGGAAAT TGGGGCAAAT GAAGAGTTAG TTTCTAATGG AAATGACAAT 420
GGTGGAGAGG CAATTGTCTT TGACAAATAT GGCTATCCAA TGGTATATGC TCCAGAAGAA 480
ATAGAGGTTG AGGAGAAGGA GTACTCGAAG TATGAAGATC TGACAATACC CATGAACCCC 540
GACTTCAATT ATGTGGAAAT AAAGGAAGAT TATGATGTTG TCTTCGATGT TAGGAATGTA 600
AAGCTGAAGC CTCCTAAGGT AAAGAACGGT AATGGGAAGG AAGGTGAAAT AATTGTTGAA 660
GCTTATGCTT CTCTCTTCAG GAGTAGGTTG AAGAAGTTAA GGAAAATACT AAGGGAAAAT 720
CCTGAATTGG ACAATGTTGT TGATATTGGG AAGCTGAAGT ATGTGAAGGA AGATGAAACC 780
GTGACAATAA TAGGGCTTGT CAATTCCAAG AGGGAAGTGA ATAAAGGATT GATATTTGAA 840
ATAGAAGATC TCACAGGAAA GGTAAAGTT TTCTTGCCGA AAGATTCGGA AGATTATAGG 900
GAGGCATTTA AGGTTCTTCC AGATGCCGTC GTCGCTTTTA AGGGGGTGTA TTCAAAGAGG 960
GCAATTTTGT ACGCCAACAA GTTTTACCTT CCAGACGTTT CCCTCTATAG GAGACAAAAG 1020
CCTCCACTGG AAGAGAAAGT TTATGCTATT CTCATAAGTG ATATACACGT CGGAAGTAAA 1080
GAGTTCTGCG AAAATGCCTT CATAAAGTTC TTAGAGTGGC TCAATGGAAG CGTTGAAACT 1140
AAGGAAGAGG AAGAAATCGT GAGTAGGGTT AAGTATCTAA TCATTGCAGG AGATGTTGTT 1200
GATGGTGTTG GCGTTTATCC GGGCCAGTAT GCCGACTTGA CGATTCCAGA TATATTCGAC 1260
CAGTATGAGG CCCTCGCAAA CCTTCTCTCT CACGTTCCCTA AGCACATAAC AATGTTTATT 1320
GCCCCAGGAA ACCACGATGC TGCTAGGCAA GCTATTCCCC AACCAGAATT CTACAAAGAG 1380
TATGCAAAAC CTATATACAA GCTCAAGAAC GCCGTGATAA TAAGCAATCC TGCTGTAATA 1440
AGACTACATG GTAGGGACTT TCTGATAGCT CATGGTAGGG GGATAGAGGA TGTCGTTGGA 1500
AGTGTTCCTG GGTGACCCA TCACAAGCCC GGCCTCCCAA TGGTTGAACT ATTGAAGATG 1560
AGGCATGTAG CTCCAATGTT TGGAGGAAAG GTTCCAATAG CTCCTGATCC AGAAGATTTG 1620
CTTGTTATAG AAGAAGTTCC TGATGTAGTT CACATGGGTC ACGTTCACGT TTACGATGCG 1680
GTAGTTTATA GGGGAGTTCA GCTGGTTAAC TCCGCCACCT GGCAGGCTCA GACCGAGTTC 1740
CAGAAGATGG TGAACATAGT TCCAACGCCT GCAAAGGTTT CCGTTGTTGA TATTGATACT 1800
GCAAAAGTTG TCAAGGTTTT GGACTTTAGT GGGTGGTGC 1839

140	145	150
Gly Gly Thr Ala Gln Ala Leu Ser Val Leu Val Gly Asp Tyr Val		
155	160	165
Arg Arg Lys Leu Gly Leu Asp Arg Phe Lys Pro Ser Gly Lys His		
170	175	180
Ile Glu Arg Met Val Glu Glu Val Asp Leu Tyr His Arg Ala Val		
185	190	195
Ser Arg Leu Gln Tyr His Pro Ser Pro Asp Glu Val Arg Leu Ala		
200	205	210
Met Arg Asn Ile Pro Ile Glu Ile Thr Gly Glu Ala Thr Asp Asp		
215	220	225
Val Glu Val Ser His Arg Asp Val Glu Gly Val Glu Thr Asn Gln		
230	235	240
Leu Arg Gly Gly Ala Ile Leu Val Leu Ala Glu Gly Val Leu Gln		
245	250	255
Lys Ala Lys Lys Leu Val Lys Tyr Ile Asp Lys Met Gly Ile Asp		
260	265	270
Gly Trp Glu Trp Leu Lys Glu Phe Val Glu Ala Lys Glu Lys Gly		
275	280	285
Glu Glu Ile Glu Glu Ser Glu Ser Lys Ala Glu Glu Ser Lys Val		
290	295	300
Glu Thr Arg Val Glu Val Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Lys Leu Tyr		
305	310	315
Glu Lys Phe Arg Ala Glu Ile Ala Pro Ser Glu Lys Tyr Ala Lys		
320	325	330
Glu Ile Ile Gly Gly Arg Pro Leu Phe Ala Gly Pro Ser Glu Asn		

335	340	345
Gly Gly Phe Arg Leu Arg Tyr Gly Arg Ser Arg Val Ser Gly Phe		
350	355	360
Ala Thr Trp Ser Ile Asn Pro Ala Thr Met Val Leu Val Asp Glu		
365	370	375
Phe Leu Ala Ile Gly Thr Gln Met Lys Thr Glu Arg Pro Gly Lys		
380	385	390
Gly Ala Val Val Thr Pro Ala Thr Thr Ala Glu Gly Pro Ile Val		
395	400	405
Lys Leu Lys Asp Gly Ser Val Val Arg Val Asp Asp Tyr Asn Leu		
410	415	420
Ala Leu Lys Ile Arg Asp Glu Val Glu Glu Ile Leu Tyr Leu Gly		
425	430	435
Asp Ala Ile Ile Ala Phe Gly Asp Phe Val Glu Asn Asn Gln Thr		
440	445	450
Leu Leu Pro Ala Asn Tyr Val Glu Glu Trp Trp Ile Gln Glu Phe		
455	460	465
Val Lys Ala Val Asn Glu Ala Tyr Glu Val Glu Leu Arg Pro Phe		
470	475	480
Glu Glu Asn Pro Arg Glu Ser Val Glu Glu Ala Ala Glu Tyr Leu		
485	490	495
Glu Val Asp Pro Glu Phe Leu Ala Lys Met Leu Tyr Asp Pro Leu		
500	505	510
Arg Val Lys Pro Pro Val Glu Leu Ala Ile His Phe Ser Glu Ile		
515	520	525
Leu Glu Ile Pro Leu His Pro Tyr Tyr Thr Leu Tyr Trp Asn Thr		

530	535	540
Val Asn Pro Lys Asp Val Glu Arg Leu Trp Gly Val Leu Lys Asp		
545	550	555
Lys Ala Thr Ile Glu Trp Gly Thr Phe Arg Gly Ile Lys Phe Ala		
560	565	570
Lys Lys Ile Glu Ile Ser Leu Asp Asp Leu Gly Ser Leu Lys Arg		
575	580	585
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Leu Pro His Thr Val Arg Glu Gly Ile		
590	595	600
Val Val Val Asp Tyr Pro Trp Ser Ala Ala Leu Leu Thr Pro Leu		
605	610	615
Gly Asn Leu Glu Trp Glu Phe Lys Ala Lys Pro Phe Tyr Thr Val		
620	625	630
Ile Asp Ile Ile Asn Glu Asn Asn Gln Ile Lys Leu Arg Asp Arg		
635	640	645
Gly Ile Ser Trp Ile Gly Ala Arg Met Gly Arg Pro Glu Lys Ala		
650	655	660
Lys Glu Arg Lys Met Lys Pro Pro Val Gln Val Leu Phe Pro Ile		
665	670	675
Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ser Arg Asp Ile Lys Lys Ala Ala Glu		
680	685	690
Glu Gly Lys Ile Ala Glu Val Glu Ile Ala Phe Phe Lys Cys Pro		
695	700	705
Lys Cys Gly His Val Gly Pro Glu Thr Leu Cys Pro Glu Cys Gly		
710	715	720
Ile Arg Lys Glu Leu Ile Trp Thr Cys Pro Lys Cys Gly Ala Glu		

725	730	735
Tyr Thr Asn Ser Gln Ala Glu Gly Tyr Ser Tyr Ser Cys Pro Lys		
740	745	750
Cys Asn Val Lys Leu Lys Pro Phe Thr Lys Arg Lys Ile Lys Pro		
755	760	765
Ser Glu Leu Leu Asn Arg Ala Met Glu Asn Val Lys Val Tyr Gly		
770	775	780
Val Asp Lys Leu Lys Gly Val Met Gly Met Thr Ser Gly Trp Lys		
785	790	795
Ile Ala Glu Pro Leu Glu Lys Gly Leu Leu Arg Ala Lys Asn Glu		
800	805	810
Val Tyr Val Phe Lys Asp Gly Thr Ile Arg Phe Asp Ala Thr Asp		
815	820	825
Ala Pro Ile Thr His Phe Arg Pro Arg Glu Ile Gly Val Ser Val		
830	835	840
Glu Lys Leu Arg Glu Leu Gly Tyr Thr His Asp Phe Glu Gly Lys		
845	850	855
Pro Leu Val Ser Glu Asp Gln Ile Val Glu Leu Lys Pro Gln Asp		
860	865	870
Val Ile Leu Ser Lys Glu Ala Gly Lys Tyr Leu Leu Arg Val Ala		
875	880	885
Arg Phe Val Asp Asp Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Gly Leu Pro Arg		
890	895	900
Phe Tyr Asn Ala Glu Lys Met Glu Asp Leu Ile Gly His Leu Val		
905	910	915
Ile Gly Leu Ala Pro His Thr Ser Ala Gly Ile Val Gly Arg Ile		

920	925	930
Ile Gly Phe Val Asp Ala Leu Val Gly Tyr Ala His Pro Tyr Phe		
935	940	945
His Ala Ala Lys Arg Arg Asn Cys Asp Gly Asp Glu Asp Ser Val		
950	955	960
Met Leu Leu Leu Asp Ala Leu Leu Asn Phe Ser Arg Tyr Tyr Leu		
965	970	975
Pro Glu Lys Arg Gly Gly Lys Met Asp Ala Pro Leu Val Ile Thr		
980	985	990
Thr Arg Leu Asp Pro Arg Glu Val Asp Ser Glu Val His Asn Met		
995	1000	1005
Asp Val Val Arg Tyr Tyr Pro Leu Glu Phe Tyr Glu Ala Thr Tyr		
1010	1015	1020
Glu Leu Lys Ser Pro Lys Glu Leu Val Arg Val Ile Glu Gly Val		
1025	1030	1035
Glu Asp Arg Leu Gly Lys Pro Glu Met Tyr Tyr Gly Ile Lys Phe		
1040	1045	1050
Thr His Asp Thr Asp Asp Ile Ala Leu Gly Pro Lys Met Ser Leu		
1055	1060	1065
Tyr Lys Gln Leu Gly Asp Met Glu Glu Lys Val Lys Arg Gln Leu		
1070	1075	1080
Thr Leu Ala Glu Arg Ile Arg Ala Val Asp Gln His Tyr Val Ala		
1085	1090	1095
Glu Thr Ile Leu Asn Ser His Leu Ile Pro Asp Leu Arg Gly Asn		
1100	1105	1110
Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Glu Phe Arg Cys Val Lys Cys Asn		

1115	1120	1125
Thr Lys Tyr Arg Arg Pro Pro Leu Asp Gly Lys Cys Pro Val Cys		
1130	1135	1140
Gly Gly Lys Ile Val Leu Thr Val Ser Lys Gly Ala Ile Glu Lys		
1145	1150	1155
Tyr Leu Gly Thr Ala Lys Met Leu Val Ala Asn Tyr Asn Val Lys		
1160	1165	1170
Pro Tyr Thr Arg Gln Arg Ile Cys Leu Thr Glu Lys Asp Ile Asp		
1175	1180	1185
Ser Leu Phe Glu Tyr Leu Phe Pro Glu Ala Gln Leu Thr Leu Ile		
1190	1195	1200
Val Asp Pro Asn Asp Ile Cys Met Lys Met Ile Lys Glu Arg Thr		
1205	1210	1215
Gly Glu Thr Val Gln Gly Gly Leu Leu Glu Asn Phe Asn Ser Ser		
1220	1225	1230
Gly Asn Asn Gly Lys Lys Ile Glu Lys Lys Glu Lys Lys Ala Lys		
1235	1240	1245
Glu Lys Pro Lys Lys Lys Lys Val Ile Ser Leu Asp Asp Phe Phe		
1250	1255	1260
Ser Lys Arg		

配列番号 : 4

配列の長さ : 3789

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

```
ATGGAGCTTC CAAAGGAAAT TGAGGAGTAT TTTGAGATGC TTCAAAGGGA AATTGACAAA 60
GCTTACGAGA TTGCTAAGAA GGCTAGGAGT CAGGGTAAAG ACCCCTCAAC CGATGTTGAG 120
ATTCCCAGG CTACAGACAT GGCTGGAAGA GTTGAGAGCT TAGTTGGCCC TCCCGGAGTT 180
GCTCAGAGAA TTAGGGAGCT TTTAAAAGAG TATGATAAGG AAATTGTTGC TTAAAGATA 240
GTTGATGAGA TAATTGAGGG CAAATTTGGT GATTTTGGAA GTAAAGAGAA GTACGCTGAA 300
CAGGCTGTAA GGACAGCCTT GGCAATATTA ACTGAGGGTA TTGTTTCTGC TCCACTTGAG 360
GGTATAGCTG ATGTTAAAAT CAAGCGAAAC ACCTGGGCTG ATAACCTCTGA ATACCTCGCC 420
CTTTACTATG CTGGGCCAAT TAGGAGTTCT GGTGGAAGCTG CTCAAGCTCT CAGTGTACTT 480
GTTGGTGATT ACGTTAGGCG AAAGCTTGGC CTTGATAGGT TTAAGCCAAG TGGGAAGCAT 540
ATAGAGAGAA TGGTTGAGGA AGTTGACCTC TATCATAGAG CTGTTTCAAG GCTTCAATAT 600
CATCCCTCAC CTGATGAAGT GAGATTAGCA ATGAGGAATA TTCCCATAGA AATCACTGGT 660
GAAGCCACTG ACGATGTGGA GGTTCCTCAT AGAGATGTAG AGGGAGTTGA GACAAATCAG 720
CTGAGAGGAG GAGCGATCCT AGTTTTGGCG GAGGGTGTTT TCCAGAAGGC TAAAAAGCTC 780
GTGAAATACA TTGACAAGAT GGGGATTGAT GGATGGGACT GGCTTAAAGA GTTTGTAGAG 840
GCTAAAGAAA AAGGTGAAGA AATCGAAGAG AGTGAAAGTA AAGCCGAGGA GTCAAAAGTT 900
GAAACAAGGG TGGAGGTAGA GAAGGGATTC TACTACAAGC TCTATGAGAA ATTTAGGGCT 960
GAGATTGCCC CAAGCGAAAA GTATGCAAAG GAAATAATTG GTGGGAGGCC GTTATTCGCT 1020
GGACCCTCGG AAAATGGGGG ATTTAGGCTT AGATATGGTA GAAGTAGGGT GAGTGGATTT 1080
GCAACATGGA GCATAAATCC AGCAACAATG GTTTTGGTTG ACGAGTTCTT GGCCATTGGA 1140
ACTCAAATGA AAACCGAGAG GCCTGGGAAA GGTGCAGTAG TGAATCCAGC AACAACCGCT 1200
GAAGGGCCGA TTGTTAAGCT AAAGGATGGG AGTGTGTGTA GGGTTGATGA TTACAATTG 1260
GCCCTCAAAA TAAGGGATGA AGTCGAAGAG ATACTTTATT TGGGAGATGC AATCATAGCC 1320
TTTGGAGACT TTGTGGAGAA CAATCAAACCT CTCCTTCCTG CAACTATGT AGAGGAGTGG 1380
```

TGGATCCAAG AGTTCGTAAA GGCCGTAAAT GAGGCATATG AAGTTGAGCT TAGACCCTTT 1440
GAGGAAAATC CCAGGGAGAG CGTTGAGGAA GCAGCAGAGT ACCTTGAAGT TGACCCAGAA 1500
TTCTTGGCTA AGATGCTTTA CGATCCTCTA AGGGTTAAGC CTCCCGTGGA GCTAGCCATA 1560
CACTTCTCGG AAATCCTGGA AATTCCTCTC CACCCATACT ACACCCTTTA TTGGAATACT 1620
GTAAATCCTA AAGATGTTGA AAGACTTTGG GGAGTATTAA AAGACAAGGC CACCATAGAA 1680
TGGGGCACTT TCAGAGGTAT AAAGTTTGCA AAGAAAATTG AAATTAGCCT GGACGACCTG 1740
GGAAGTCTTA AGAGAACCCT AGAGCTCCTG GGACTTCCTC ATACGGTAAG AGAAGGGATT 1800
GTAGTGGTTG ATTATCCGTG GAGTGCAGCT CTTCTCACTC CATTGGGCAA TCTTGAATGG 1860
GAGTTTAAGG CCAAGCCCTT CTACACTGTA ATAGACATCA TTAACGAGAA CAATCAGATA 1920
AAGCTCAGGG ACAGGGGAAT AAGCTGGATA GGGGCAAGAA TGGGAAGGCC AGAGAAGGCA 1980
AAAGAAAGAA AAATGAAGCC ACCTGTTCAA GTCCTCTTCC CAATTGGCTT GGCAGGGGGT 2040
TCTAGCAGAG ATATAAAGAA GGCTGCTGAA GAGGGAAAAA TAGCTGAAGT TGAGATTGCT 2100
TTCTTCAAGT GTCCGAAGTG TGGCCATGTA GGGCCTGAAA CTCTCTGTCC CGAGTGTGGG 2160
ATTAGGAAAG AGTTGATATG GACATGTCCC AAGTGTGGGG CTGAATACAC CAATTCCCAG 2220
GCTGAGGGGT ACTCGTATTC ATGTCCAAAG TGCAATGTGA AGCTAAAGCC ATTCACAAAG 2280
AGGAAGATAA AGCCCTCAGA GCTCTTAAAC AGGCCCATGG AAAACGTGAA GGTTTATGGA 2340
GTTGACAAGC TTAAGGGCGT AATGGGAATG ACTTCTGGCT GGAAGATTGC AGAGCCGCTG 2400
GAGAAAGGTC TTTTGAGAGC AAAAAATGAA GTTTACGTCT TTAAGGATGG AACCATAAGA 2460
TTTGATGCCA CAGATGCTCC AATAACTCAC TTTAGGCCTA GGGAGATAGG AGTTTCAGTG 2520
GAAAAGCTGA GAGAGCTTGG CTACACCCAT GACTTCCAAG GGAAACCTCT GGTGAGTGAA 2580
GACCAGATAG TTGAGCTTAA GCCCCAAGAT GTAATCCTCT CAAAGGAGGC TGGCAAGTAC 2640
CTCTTAAGAG TGGCCAGGTT TGTGATGAT CTTCTTGAGA AGTTCTACGG ACTTCCCAGG 2700
TTCTACAACG CCGAAAAAAT GGAGGATTTA ATTGGTCACC TAGTGATAGG ATTGGCCCCCT 2760
CACACTTCAG CCGGAATCGT GGGGAGGATA ATAGGCTTTG TAGATGCTCT GGTGAGCTAC 2820
GCTCACCCTT ACTTCCATGC GGCCAAGAGA AGGAACTGTG ATGGAGATGA GGATAGTGTA 2880
ATGCTACTCC TTGATGCCCT ATTGAACTTC TCCAGATACT ACCTCCCCGA AAAAAGAGGA 2940

GGAAAAATGG ACGCTCCTCT TGTGATAACC ACGAGGCTTG ATCCAAGAGA GGTGGACAGT 3000
GAAGTGCACA ACATGGATGT CGTTAGATAC TATCCATTAG AGTTCTATGA AGCAACTTAC 3060
GAGCTTAAAT CACCAAAGGA ACTTGTGAGA GTTATAGAGG GAGTTGAAGA TAGATTAGGA 3120
AAGCCTGAAA TGTATTACGG AATAAAGTTC ACCCAGGATA CCGACGACAT AGCTCTAGGA 3180
CCAAAGATGA GCCTCTACAA GCAGTTGGGA GATATGGAGG AGAAAGTGAA GAGGCAATTG 3240
ACATTGGCAG AGAGAATTAG AGCTGTGGAT CAACACTATG TTGCTGAAAC AATCCTCAAC 3300
TCCCACTTAA TTCCCGACTT GAGGGGTAAC CTAAGGAGCT TTAGTAGACA AGAATTTTCG 3360
TGTGTGAAGT GTAACACAAA GTACAGAAGG CCGCCCTTGG ATGGAAAATG CCCAGTCTGT 3420
GGAGGAAAGA TAGTGCTGAC AGTTAGCAAA GGAGCCATTG AAAAGTACTT GGGGACTGCC 3480
AAGATGCTCG TAGCTAACTA CAACGTAAAG CCATATACAA GGCAGAGAAT ATGCTTGACG 3540
GAGAAGGATA TTGATTCACT CTTTGAGTAC TTATTCCCAG AAGCCCAGTT AACGCTCATT 3600
GTAGATCCAA ACGACATCTG TATGAAAATG ATCAAGGAAA GAACGGGGGA AACAGTTCAA 3660
GGAGGCCTGC TTGAGAACTT TAATTCCTCT GGAAATAATG GGAAGAAAAT AGAGAAGAAG 3720
GAGAAAAAGG CAAAGGAAAA GCCTAAAAAG AAGAAAGTTA TAAGCTTGGA CGACTTCTTC 3780
TCCAAACGC 3789

配列番号 : 5

配列の長さ : 8450

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

CATAACTAAA TTATTACATT TAGTTATATG GATGGGGGAA AAATTAACAA CATGTGTTAT 60
GTTTCCTCTG GAAAATTGAT CTATAATAAT CTAGGAGCAC AATTTCCAAT GGAGGGTCAT 120
CAATGAACGA AGGTGAACAT CAAATAAAGC TTGACGAGCT ATTCGAAAAG TTGCTCCGAG 180

CTAGGAAGAT ATTCAAAAC AAAGATGTCC TTAGGCATAG CTATACTCCC AAGGATCTAC 240
CTCACAGACA TGAGCAAATA GAAACTCTCG CCCAAATTTT AGTACCAGTT CTCAGAGGAG 300
AAACTCCATC AAACATATTC GTTTATGGGA AGACTGGAAC TGGAAAGACT GTAAGTGTAA 360
AATTTGTAAC TGAAGAGCTG AAAAGAATAT CTGAAAAATA CAACATTCCA GTTGATGTGA 420
TCTACATTAA TTGTGAGATT GTCCATACTC ACTATAGAGT TCTTGCTAAC ATAGTAACT 480
ACTTCAAAGA TGAGACTGGG ATTGAAGTTC CAATGGTAGG TTGGCCTACC GATGAAGTTT 540
ACGCAAAGCT TAAGCAGGTT ATAGATATGA AGGAGAGGTT TGTGATAATT GTGTTGGATG 600
AAATTGACAA GTGGTAAAGA AGAGTGGTGA TGAGGTTCTC TATTCATTAA CAAGAATAAA 660
TACTGAACCT AAAAGGGCTA AAGTGAGTGT AATTGGTATA TCAAACGACC TTAAATTTAA 720
AGAGTATCTA GATCCAAGAG TTCTCTCAAG TTTGAGTGAG GAAGAGGTGG TATTTCCACC 780
CTATGATGCA AATCAGCTTA GGGATATACT GACCCAAAGA GCTGAAGAGG CCTTTTATCC 840
TGGGGTTTTA GACGAAGGTG TGATTCCCCT CTGTGCAGCA TTAGCTGCTA GAGAGCATGG 900
AGATGCAAGA AAGGCACTTG ACCTTCTAAG AGTTGCAGGG GAAATAGCGG AAAGAGAAGG 960
GGCAAGTAAA GTAAGTAAA AGCATGTTTG GAAAGCCCAG GAAAAGATTG AACAGGACAT 1020
GATGGAGGAG GTAATAAAAA CTCTACCCCT TCAGTCAAAA GTTCTCCTCT ATGCCATAGT 1080
TCTTTTGGAC GAAAACGGCG ATTTACCAGC AAATACTGGG GATGTTTACG CTGTTTATAG 1140
GGAATTGTGC GAGTACATTG ACTTGGAACC TCTCACCCAA AGAAGGATAA GTGATCTAAT 1200
TAATGAGCTT GACATGCTTG GAATAATAAA TGCAAAAGTT GTTAGTAAGG GGAGATATGG 1260
GAGGACAAAG GAAATAAGGC TTAACGTTAC CTCATATAAG ATAAGAAATG TGCTGAGATA 1320
TGATTACTCT ATTCAGCCCC TCCTCACAAT TTCCCTTAAG AGTGAGCAGA GGAGGTTGAT 1380
CTAATGGATG AATTTGTAAA ATCACTTCTA AAAGCTAACT ATCTAATAAC TCCCTCTGCC 1440
TACTATCTCT TGAGAGAATA CTATGAAAAA GGTGAATTCT CAATTGTGGA GCTGGTAAAA 1500
TTTGCAAGAT CAAGAGAGAG CTACATAATT ACTGATGCTT TAGCAACAGA ATTCCTTAAA 1560
GTAAAGGCC TTGAACCAAT TCTTCCAGTG GAAACAAAGG GGGGTTTTGT TTCCACTGGA 1620
GAGTCCCAA AAGAGCAGTC TTATGAAGAG TCTTTTGGGA CTAAAGAAGA AATTTCCAG 1680
GAGATTAAAG AAGGAGAGAG TTTTATTTCC ACTGGAAGTG AACCATTGA AGAGGAGCTC 1740

AATAGCATTG GAATTGAGGA AATTGGGGCA AATGAAGAGT TAGTTTCTAA TGGAAATGAC 1800
AATGGTGGAG AGGCAATTGT CTTTGACAAA TATGGCTATC CAATGGTATA TGCTCCAGAA 1860
GAAATAGAGG TTGAGGAGAA GGAGTACTCG AAGTATGAAG ATCTGACAAT ACCCATGAAC 1920
CCCGACTTCA ATTATGTGGA AATAAAGGAA GATTATGATG TTGTCTTCGA TGTTAGGAAT 1980
GTAAAGCTGA AGCCTCCTAA GGTAAGAAGC GGTAATGGGA AGGAAGGTGA AATAATTGTT 2040
GAAGCTTATG CTTCTCTCTT CAGGAGTAGG TTGAAGAAGT TAAGGAAAAT ACTAAGGGAA 2100
AATCCTGAAT TGGACAATGT TGTGATATT GGGAAAGCTGA AGTATGTGAA GGAAGATGAA 2160
ACCGTGACAA TAATAGGGCT TGTCAATTCC AAGAGGGAAG TGAATAAAGG ATTGATATTT 2220
GAAATAGAAG ATCTCACAGG AAAGGTAAA GTTTTCTTGC CGAAAGATTC GGAAGATTAT 2280
AGGGAGGCAT TTAAGGTTCT TCCAGATGCC GTCGTCGCTT TTAAGGGGGT GTATTCAAAG 2340
AGGGGAATTT TGTACGCCAA CAAGTTTTAC CTTCCAGACG TTCCCCTCTA TAGGAGACAA 2400
AAGCCTCCAC TGAAGAGAA AGTTTATGCT ATTCTCATAA GTGATATACA CGTCGGAAGT 2460
AAAGAGTTCT GCGAAAATGC CTTCATAAAG TTCTTAGAGT GGCTCAATGG AAACGTTGAA 2520
ACTAAGGAAG AGGAAGAAAT CGTGAGTAGG GTTAAGTATC TAATCATTGC AGGAGATGTT 2580
GTTGATGGTG TTGGCGTTTA TCCGGGCCAG TATGCCGACT TGACGATTCC AGATATATTC 2640
GACCAGTATG AGGCCCTCGC AAACCTTCTC TCTCACGTTT CTAAGCACAT AACAATGTTT 2700
ATTGCCCCAG GAAACCACGA TGCTGCTAGG CAAGCTATTC CCCAACCAGA ATTCTACAAA 2760
GAGTATGCAA AACCTATATA CAAGCTCAAG AAGCCCGTGA TAATAAGCAA TCCTGCTGTA 2820
ATAAGACTAC ATGGTAGGGA CTTTCTGATA GCTCATGGTA GGGGGATAGA GGATGTCGTT 2880
GGAAGTGTTT CTGGGTTGAC CCATCACAAG CCCGGCCTCC CAATGGTTGA ACTATTGAAG 2940
ATGAGGCATG TAGCTCCAAT GTTTGGAGGA AAGGTTCCAA TAGCTCCTGA TCCAGAAGAT 3000
TTGCTTGTTA TAGAAGAAGT TCCTGATGTA GTTCACATGG GTCACGTTCA CGTTTACGAT 3060
GCGGTAGTTT ATAGGGGAGT TCAGCTGGTT AACTCCGCCA CCTGGCAGGC TCAGACCGAG 3120
TTCCAGAAGA TGGTGAACAT AGTTCCAACG CCTGCAAAGG TTCCCGTTGT TGATATTGAT 3180
ACTGCAAAAG TTGTCAAGGT TTTGGACTTT AGTGGGTGGT GCTGATGGAG CTTCCAAAGG 3240
AAATTGAGGA GTATTTTGAG ATGCTTCAAA GGGAAATTGA CAAAGCTTAC GAGATTGCTA 3300

AGAAGGCTAG GAGTCAGGCT AAAGACCCCT CAACCGATGT TGAGATTCCC CAGGCTACAG 3360
ACATGGCTGG AAGAGTTGAG AGCTTAGTTG GCCCTCCCGG AGTTGCTCAG AGAATTAGGG 3420
AGCTTTTAAA AGAGTATGAT AAGGAAATTG TTGCTTTAAA GATAGTTGAT GAGATAATTG 3480
AGGGCAAATT TGGTGATTTT GGAAGTAAAG AGAAGTACGC TGAACAGGCT GTAAGGACAG 3540
CCTTGGCAAT ATTAACCTGAG GGTATTGTTT CTGCTCCACT TGAGGGTATA GCTGATGTTA 3600
AAATCAAGCG AAACACCTGG GCTGATAACT CTGAATACCT CGCCCTTTAC TATGCTGGGC 3660
CAATTAGGAG TTCTGGTGA ACTGCTCAAG CTCTCAGTGT ACTTGTTGGT GATTACGTTA 3720
GGCGAAAGCT TGGCCTTGAT AGGTTTAAGC CAAGTGGGAA GCATATAGAG AGAATGGTTG 3780
AGGAAGTTGA CCTCTATCAT AGAGCTGTTT CAAGGCTTCA ATATCATCCC TCACCTGATG 3840
AAGTGAGATT AGCAATGAGG AATATTCCCA TAGAAATCAC TGGTGAAGCC ACTGACGATG 3900
TGGAGGTTTC CCATAGAGAT GTAGAGGGAG TTGAGACAAA TCAGCTGAGA GGAGGAGCGA 3960
TCCTAGTTTT GGCGGAGGCT GTTCTCCAGA AGGCTAAAAA GCTCGTGAAA TACATTGACA 4020
AGATGGGGAT TGATGGATGG GAGTGGCTTA AAGAGTTTGT AGAGGCTAAA GAAAAAGGTG 4080
AAGAAATCGA AGAGAGTGAA AGTAAAGCCG AGGAGTCAAA AGTTGAAACA AGGCTGGAGG 4140
TAGAGAAGGG ATTCTACTAC AAGCTCTATG AGAAATTTAG GGCTGAGATT GCCCCAAGCG 4200
AAAAGTATGC AAAGGAAATA ATTGGTGGGA GGCCGTATT CGCTGGACCC TCGGAAATG 4260
GGGGATTTAG GCTTAGATAT GGTAGAAGTA GGGTGAGTGG ATTTGCAACA TGGAGCATAA 4320
ATCCAGCAAC AATGGTTTTG GTTGACGAGT TCTTGGCCAT TGGAAC TCA ATGAAAACCG 4380
AGAGGCCTGG GAAAGGTGCA GTAGTACTC CAGCAACAAC CGCTGAAGGG CCGATTGTTA 4440
AGCTAAAGGA TGGGAGTGTT GTTAGGGTTG ATGATTACAA CTTGGCCCTC AAAATAAGGG 4500
ATGAAGTCGA AGAGATACTT TATTTGGGAG ATGCAATCAT AGCCTTTGGA GACTTTGTGG 4560
AGAACAATCA AACTCTCCTT CCTGCAAACT ATGTAGAGGA GTGGTGGATC CAAGAGTTG 4620
TAAAGGCCGT TAATGAGGCA TATGAAGTTG AGCTTAGACC CTTTGAGGAA AATCCCAGGG 4680
AGAGCGTTGA GGAAGCAGCA GAGTACCTTG AAGTTGACCC AGAATTCTTG GCTAAGATGC 4740
TTTACGATCC TCTAAGGTT AAGCCTCCCG TGGAGCTAGC CATACACTTC TCGGAAATCC 4800
TGGAAATTCC TCTCCACCCA TACTACACCC TTTATTGGAA TACTGTAAAT CCTAAAGATG 4860

TTGAAAGACT TTGGGGAGTA TTAAAAGACA AGGCCACCAT AGAATGGGGC ACTTTCAGAG 4920
GTATAAGTT TGCAAAGAAA ATTGAAATTA GCCTGGACGA CCTGGGAAGT CTTAAGAGAA 4980
CCCTAGAGCT CCTGGGACTT CCTCATACGG TAAGAGAAGG GATTGTAGTG GTTGATTATC 5040
CGTGGAGTGC AGCTCTTCTC ACTCCATTGG GCAATCTTGA ATGGGAGTTT AAGGCCAAGC 5100
CCTTCTACAC TGTAATAGAC ATCATTAAAG AGAACAATCA GATAAAGCTC AGGGACAGGG 5160
GAATAAGCTG GATAGGGGCA AGAATGGGAA GGCCAGAGAA GGCAAAAGAA AGAAAAATGA 5220
AGCCACCTGT TCAAGTCCTC TTCCCAATTG GCTTGGCAGG GGGTTCTAGC AGAGATATAA 5280
AGAAGGCTGC TGAAGAGGGA AAAATAGCTG AAGTTGAGAT TGCTTTCTTC AAGTGTCCGA 5340
AGTGTGGCCA TGTAGGGCCT GAAACTCTCT GTCCCGAGTG TGGGATTAGG AAAGAGTTGA 5400
TATGGACATG TCCAAGTGT GGGGCTGAAT ACACCAATTC CCAGGCTGAG GGGTACTCGT 5460
ATTCATGTCC AAAGTCCAAT GTGAAGCTAA AGCCATTAC AAAGAGGAAG ATAAAGCCCT 5520
CAGAGCTCTT AAACAGGGCC ATGGAAAACG TGAAGGTTTA TGGAGTTGAC AAGCTTAAGG 5580
GCGTAATGGG AATGACTTCT GGCTGGAAGA TTGCAGAGCC GCTGGAGAAA GGTCTTTTGA 5640
GAGCAAAAAA TGAAGTTTAC GTCTTTAAGG ATGGAACCAT AAGATTGAT GCCACAGATG 5700
CTCCAATAAC TCACTTTAGG CCTAGGGAGA TAGGAGTTTC AGTGGAAAAG CTGAGAGAGC 5760
TTGGCTACAC CCATGACTTC GAAGGGAAAC CTCTGGTGAG TGAAGACCAG ATAGTTGAGC 5820
TTAAGCCCCA AGATGTAATC CTCTCAAAGG AGGCTGGCAA GTACCTCTTA AGAGTGGCCA 5880
GGTTTGTGTA TGATCTTCTT GAGAAGTTCT ACGGACTTCC CAGGTTCTAC AACGCCGAAA 5940
AAATGGAGGA TTTAATTGGT CACCTAGTGA TAGGATTGGC CCCTCACACT TCAGCCGGAA 6000
TCGTGGGGAG GATAATAGGC TTTGTAGATG CTCTGGTTGG CTACGCTCAC CCCTACTTCC 6060
ATGCGGCCAA GAGAAGGAAC TGTGATGGAG ATGAGGATAG TGTAATGCTA CTCCTTGATG 6120
CCCTATTGAA CTTCTCCAGA TACTACCTCC CCGAAAAAAG AGGAGGAAAA ATGGACGCTC 6180
CTCTTGTCAT AACCACGAGG CTTGATCCAA GAGAGGTGGA CAGTGAAGTG CACAACATGG 6240
ATGTCGTTAG ATACTATCCA TTAGAGTTCT ATGAAGCAAC TTACGAGCTT AAATCACCAA 6300
AGGAACTTGT GAGAGTTATA GAGGGAGTTG AAGATAGATT AGGAAAGCCT GAAATGTATT 6360
ACGGAATAAA GTTCACCCAC GATACCGACG ACATAGCTCT AGGACCAAAG ATGAGCCTCT 6420

ACAAGCAGTT GGGAGATATG GAGGAGAAAAG TGAAGAGGCA ATTGACATTG GCAGAGAGAA 6480
TTAGAGCTGT GGATCAACAC TATGTTGCTG AAACAATCCT CAACTCCAC TTAATTCCCG 6540
ACTTGAGGGG TAACCTAAGG AGCTTTACTA GACAAGAATT TCGCTGTGTG AAGTGTAACA 6600
CAAAGTACAG AAGGCCGCCC TTGGATGGAA AATGCCAGT CTGTGGAGGA AAGATAGTGC 6660
TGACAGTTAG CAAAGGAGCC ATTGAAAAGT ACTTGGGGAC TGCCAAGATG CTCGTAGCTA 6720
ACTACAACGT AAAGCCATAT ACAAGGCAGA GAATATGCTT GACGGAGAAG GATATTGATT 6780
CACTCTTTGA GTACTTATTC CCAGAAGCCC AGTTAACGCT CATTGTAGAT CCAAACGACA 6840
TCTGTATGAA AATGATCAAG GAAAGAACGG GGGAAACAGT TCAAGGAGGC CTGCTTGAGA 6900
ACTTTAATTC CTCTGGAAAT AATGGGAAGA AAATAGAGAA GAAGGAGAAA AAGGCAAAGG 6960
AAAAGCCTAA AAAGAAGAAA GTTATAAGCT TGGACGACTT CTTCTCCAAA CGCTGACCAC 7020
AACTTTTAAG TTCTTTCTTG AGAATAAATT CCCAGGTGGC TTAGAGAATG AAGATTGTGT 7080
GGTGTGGTCA TGCCTGCTTC TTGGTGGAGG ATAGGGGGAC TAAGATACTA ATCGATCCAT 7140
ACCCAGACGT TGATGAAGAC AGAATAGGCA AGGTGCGATTA CATTCTAGTT ACCCAGGAGC 7200
ACATGGATCA CTACGGTAAG ACCCCACTAA TAGCAAAGCT CAGTGATGCC GAGGTTATAG 7260
GGCCGAAAAC AGTTTATCTC ATGGCAATAA GTGATGGGCT AACAAAGGTC AGAGAGATAG 7320
AGGTGGGACA GGAAATCGAG CTGGGAGATA TTAGGGTTAG GGCATTTTTC ACAGAGCATC 7380
CAACAAGCCA GTATCCCCTG GGATATCTAA TTGAAGGAAG CAAAAGAGTG GCTCACTTGG 7440
GAGATACATA CTACAGTCCA GCTTTTACAG AGTTGAGGGG AAAGGTTGAT GTTCTTTTGG 7500
TTCCAATAGG TGGGAAGTCC ACCGCTAGTG TAAGGGAGGC TGCGGATATA GTGGAGATGA 7560
TAAGGCCAG GATAGCAGTT CCAATGCACT ATGGAACGTA CAGCGAGGCC GATCCTGAAG 7620
AGTTCAAGAA GGAGCTCCAA AAAAGGCGCA TATGGGTTTT AGTAAAGGAT CTTAAGCCCT 7680
ATGAGGGTTT TGAAATCTGA AGGTGTTTCA ATGCTAAATA CTGAGCTCTT AACCACTGGA 7740
GTCAAGGGGT TAGATGAGCT TTTAGGTGGT GGAGTTGCTA AGGGAGTAAT ACTCCAAGTT 7800
TACGGGCCAT TTGCCACCGG GAAGACAAC TTTGCAATGC AGGTTGGATT ATTGAATGAG 7860
GGAAAAGTGG CTTATGTTGA TACTGAGGGG GGATTCTCCC CCGAAAGGTT AGCTCAAATG 7920
GCAGAATCAA GGAAC TTGGA TGTGGAGAAA GCACTTGAAA AGTTCGTGAT ATTCGAACCT 7980

ATGGATTAA ACGAGCAAAG ACAGGTAATT GCGAGGTGA AAAATATCGT GAATGAAAAG 8040
TTTTCTTTAG TTGTGGTCGA CTCCTTTACG GCCCATTATA GAGCGGAGGG GAGTAGAGAG 8100
TATGGAGAAC TTTCCAAGCA ACTCCAAGTT CTTCACTGGA TTGCCAGAAG AAAAAACGTT 8160
GCCGTTATAG TTGTCAATCA AGTTTATTAC GATTCAAACCT CAGGAATTCT TAAACCAATA 8220
GCTGAGCACA CCCTGGGGTA CAAAACAAAG GACATCCTCC GCTTTGAAAG GCTTAGGGTT 8280
GGAGTGAGAA TTGCAGTTCT GGAAAGGCAT AGGTTTAGGC CAGAGGGTGG GATGGTATAC 8340
TTCAAAATAA CAGATAAAGG ATTGGAGGAT GTAAAAACG AAGATTAGAG CCTGTCGTAG 8400
ACCTCCTGGG CAATCCTCAG CGTTGCCTTA TAGAGCTTCT CACTAATAAT 8450

配列番号 : 6

配列の長さ : 45

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CCGGAACCGC CTCCTCAGA GCCGCCACCC TCAGAACCGC CACCC

45

配列番号 : 7

配列の長さ : 17

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成RNA)

配列 :

GUUUUCCAG UCACGAC

17

配列番号 : 8

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACT

23

配列番号 : 9

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

ACAAAGCCAG CCGGAATATC TG

22

配列番号 : 10

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TACAATACGA TGCCCCGTTA AG

22

配列番号 : 11

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

CAGAGGAGGT TGATCCCATG GATGAATTTG TA

32

配列番号 : 12

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列 :

TTTAGTGGGT GGTGCCCCATG GAGCTTCCAA AG

32

請 求 の 範 囲

1. 以下の性質を有することを特徴とするDNAポリメラーゼ。

① 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。

② 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

③ λ-DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 反応を以下の条件で行った場合、約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である。

PCRの条件:

(a) 反応液組成: 10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)、3.5 mM MgCl₂、7.5 mM KCl、400 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1% トリトンX-100、5.0 ng/50 μl λ-DNA、10 pmole/50 μl プライマーλ1 (配列表の配列番号8)、およびプライマーλ11 (配列表の配列番号9)、3.7単位/50 μl DNAポリメラーゼを含む。

(b) 反応条件: 98°C、10秒〜68°C、10分を1サイクルとした30サイクルのPCR反応を行う。

2. Taq DNAポリメラーゼと比較してDNA合成時の誤りの頻度が低いことを特徴とする請求項1記載のDNAポリメラーゼ。

3. ゲルろ過法による分子量が約220キログルトン、あるいは約385キログルトンである請求項1又は2記載のDNAポリメラーゼ。

4. 2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク（第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクおよび第2のDNAポリメラーゼ構成タンパク）の共存により活性を示すことを特徴とする請求項1～3いずれか記載のDNAポリメラーゼ。

5. 第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクおよび第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクのSDS-PAGEによる分子量が、それぞれ約90,000ダルトン、約140,000ダルトンであることを特徴とする請求項4記載のDNAポリメラーゼ。

6. 請求項4又は5に記載のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴とする請求項4又は5記載のDNAポリメラーゼ。

7. 請求項4又は5に記載のDNAポリメラーゼを構成する第2のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴とする請求項4又は5記載のDNAポリメラーゼ。

8. 請求項4又は5に記載のDNAポリメラーゼを構成する第1のDNAポリメラーゼ構成タンパクが、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であり、かつ請求項4又は5に記載のDNAポリメラーゼを構成する第2のDNAポリメラーゼ構成タンパ

クが、配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物であることを特徴とする請求項 4 又は 5 記載の DNA ポリメラーゼ。

9. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物としてのアミノ酸配列からなる、請求項 4 又は 5 に記載の DNA ポリメラーゼを構成する第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパク。

10. 配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるか、あるいは該アミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加、又は置換した実質的に同等の活性を有する機能的同等物としてのアミノ酸配列からなる、請求項 4 又は 5 に記載の DNA ポリメラーゼを構成する第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパク。

11. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいは配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換されたアミノ酸配列からなり、かつ第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードすることを特徴とする、請求項 9 に記載の第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含む DNA。

12. 配列表の配列番号 2 に示される塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいはこの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列から

なることを特徴とする、請求項 9 に記載の第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含む DNA。

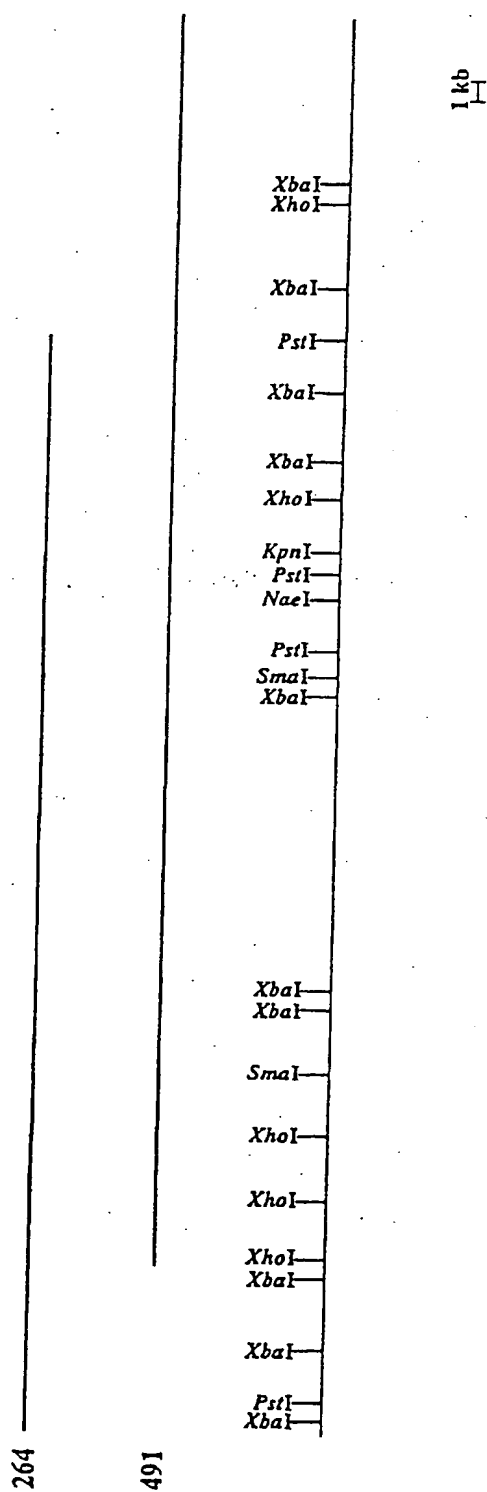
13. 配列表の配列番号 3 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいは配列番号 3 のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、挿入、付加または置換されたアミノ酸配列からなり、かつ第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクとしての機能を有するタンパクをコードすることを特徴とする、請求項 10 に記載の第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含む DNA。

14. 配列表の配列番号 4 に示される塩基配列の全部又は一部を含むか、あるいはこの配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能な塩基配列からなることを特徴とする、請求項 10 に記載の第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする塩基配列を含む DNA。

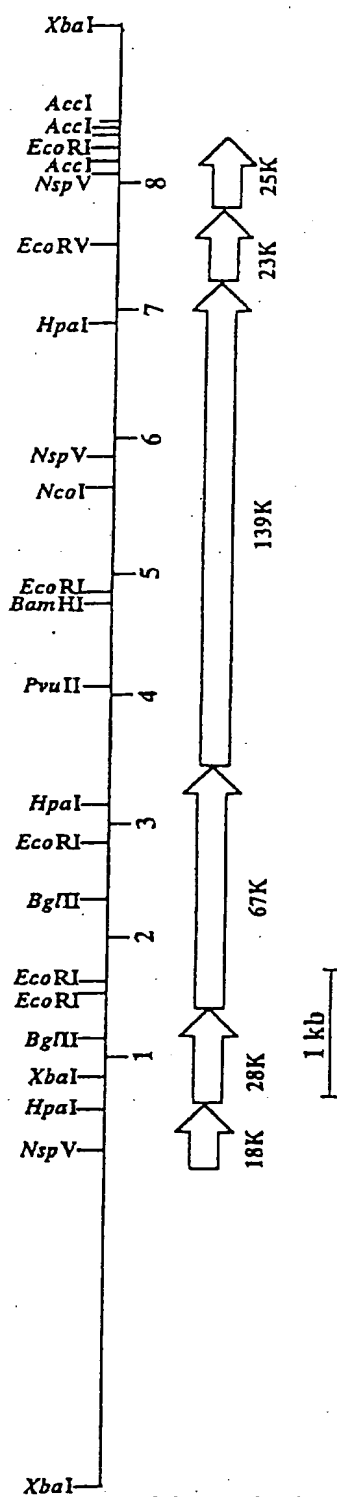
15. 請求項 11 又は 12 に記載の第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子と、請求項 13 又は 14 に記載の第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子の両方を含有する形質転換体を培養し、該培養物から DNA ポリメラーゼを採取することを特徴とする DNA ポリメラーゼの製造方法。

16. 請求項 11 又は 12 に記載の第 1 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体と、請求項 13 又は 14 に記載の第 2 の DNA ポリメラーゼ構成タンパクをコードする遺伝子を含有する形質転換体とをそれぞれ個別に培養し、該培養物中に含まれる DNA ポリメラーゼ構成タンパクを混合して DNA ポリメラーゼを採取することを特徴とする DNA ポリメラーゼ

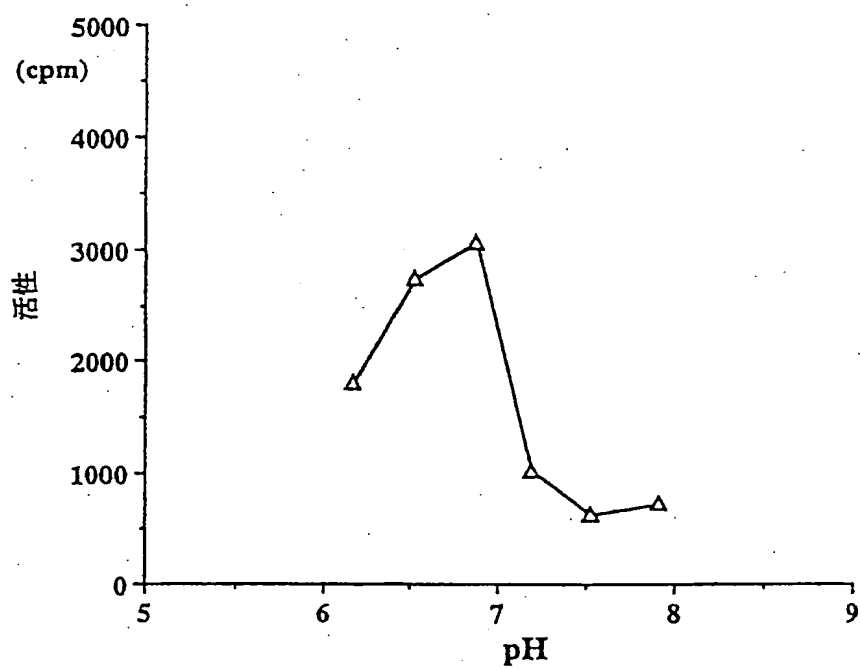
の製造方法。



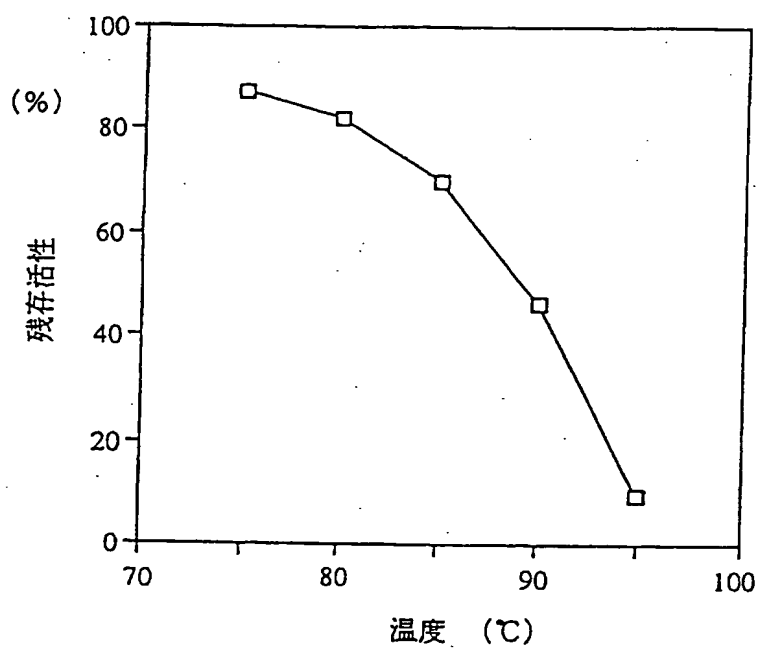
第 1 図



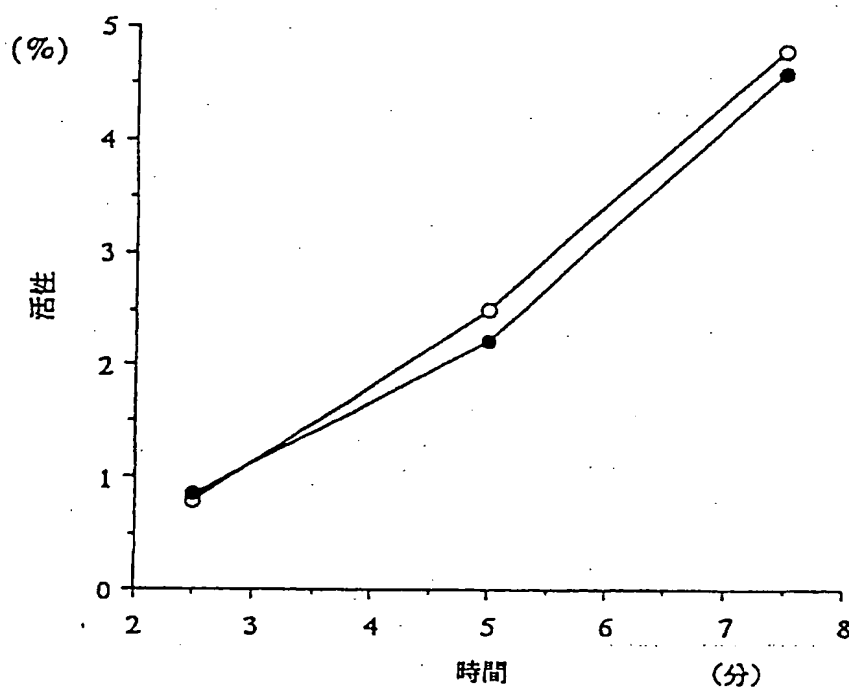
第 2 図



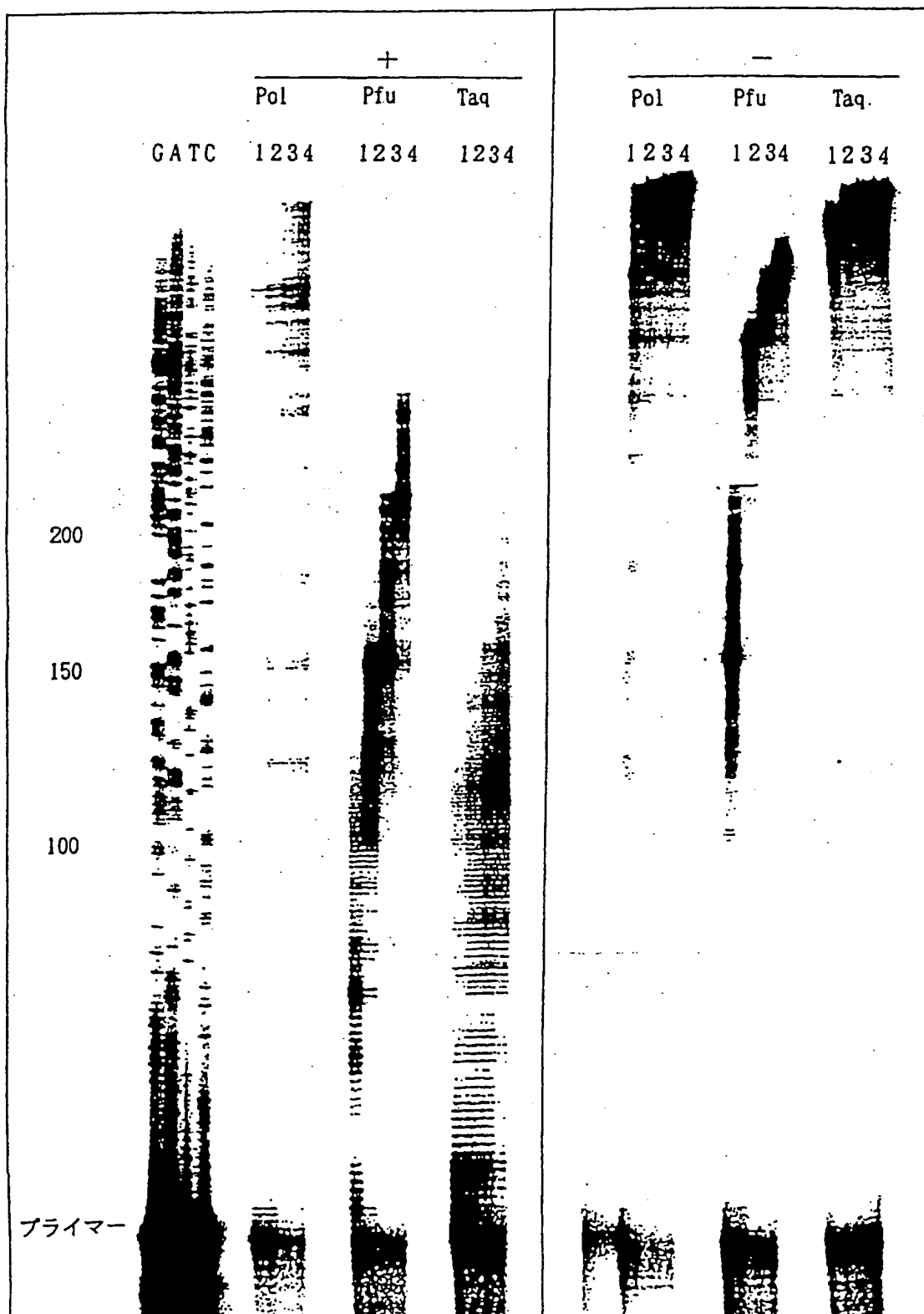
第 3 図



第4図



第 5 図



第 6 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/54, C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/54, C12N9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPI,L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Anal. Biochem. 231(1) 1995 Ju Jingyue et al. "Design and synthesis of fluorescence energy transfer dye-labeled primers and their application for DNA sequencing and analysis" p. 131-140	1 - 16
A	WO, 9426766, A (Barnes, Wayne M.), November 24, 1994 (24. 11. 94) & US, 543619, A & EP, 693078, A	1 - 16
	WO, 9317127, A (Oregon State Board of Higher Education), September 2, 1993 (02. 09. 93) & US, 5470724, A	1 - 16
A	J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28(1) 1990 Linz, Ute et al. "Systematic studies on paramaters influencing the performance of the polymerase chain reaction" p. 5-13	1 - 16
X/A	WO, 9209689, A (Stratagene),	1 - 16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 1, 1997 (01. 04. 97)

Date of mailing of the international search report

April 15, 1997 (15. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03869

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document; with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	June 11, 1992 (11. 06. 92) (Family: none)	
A	EP, 669401, A (Hoffman La Roche Inc.), August 30, 1995 (30. 08. 95) & JP, 8038198, A & US, 5512462, A	1 - 16
A	WO, 9516028, A (Stratagene), June 15, 1995 (15. 06. 95) & US, 5556772, A	1 - 16
X/AL	Nucleic Acids Res. 20(7) 1992 Forterre, Patrick "The DNA polymerase from the archaebacterium pyrococcus furiosus does not testify for a specific relationship between archaebacteria and eukaryotes" p. 1881	1/2-16
X/A	Gene 108(1) 1991 Lundberg, Kelly S. et al. "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from pyrococcus furiosus" p. 1-6	1-2/3-16
A	J. Bacteriol. 177(8) 1995 Uemori, Takashi et al. "The hyperthermophilic archaeon pyrodictum ocultium has two alpha-like DNA polymerase" p. 2164-2177	1 - 16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 96/03869

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/54, C12N9/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/54, C12N9/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE, BIOSIS, WPI/WPI, L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Anal. Biochem. 231(1) 1995 Ju Jingyue et al. 「Design and synthesis of fluorescence energy transfer dye-labeled primers and their application for DNA sequencing and analysis」 p. 131-140	1-16
A	WO, 9426766, A (Barnes, Wayne M.) 24. 11. 1994 (24. 11. 94) & US, 543619, A & EP, 693078, A	1-16
A	WO, 9317127, A (Oregon State Board of Higher Education) 2. 9. 1993 (02. 09. 93) & US, 5470724, A	1-16
A	J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28(1) 1990 Linz, Ute et al. 「Systematic studies on paramaters influencing the performance of the polymerase chain reaction」 p. 5-13	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 04. 97

国際調査報告の発送日

15.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 美奈子

4 B

9359

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO, 9209689, A (Stratagene) 11. 6月. 1992(11. 06. 92) (Family:none)	1-16
A	EP, 669401, A (Hoffman La Roche Inc) 30. 8月. 1995(30. 08. 95) & JP, 8038198, A & US, 5512462, A	1-16
A	WO, 9516028, A (Stratagene) 15. 6月. 1995(15. 06. 95) & US, 5556772, A	1-16
X/A	Nucleic Acids Res. 20(7) 1992 Forterre, Patrick 「The DNA polymerase from the archaebacterium pyrococcus furiosus does not testify for a specific relationship between archaebacteria and eukaryotes」 p. 1881	1/2-16
X/A	Gene 108(1) 1991 Lundberg, Kelly S. et al. 「High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from pyrococcus furiosus」 p. 1-6	1-2/3-16
A	J. Bacteriol. 177(8) 1995 Uemori, Takashi et al. 「The hyperthermophilic archaeon pyrodictium oculitium has two alpha-like DNA polymerase」 p. 2164-2177	1-16